

Université de Montréal

**Propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques
formés par la toxine nématocide Cry5Ba du bacille de
Thuringe dans les bicouches lipidiques planes**

par

Valbona Karabrahimi

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences

en Physiologie

Option Physiologie et Biophysique Moléculaires

Avril, 2013

© Valbona Karabrahimi, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques formés par la toxine nématocide Cry5Ba
du bacille de Thuringe dans les bicouches lipidiques planes

présenté par :

Valbona Karabrahimi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent, Ph.D., présidente-rapporteure

Jean-Yves Lapointe, Ph.D., membre du jury

Jean-Louis Schwartz, Ph.D., directeur de recherche

Résumé

Les toxines Cry sont des protéines synthétisées sous forme de cristaux par la bactérie bacille de Thuringe pendant la sporulation. Elles sont largement utilisées comme agents de lutte biologique, car elles sont toxiques envers plusieurs espèces d'invertébrées, y compris les nématodes. Les toxines Cry5B sont actives contre certaines espèces de nématodes parasites, y compris *Ankylostoma ceylanicum* un parasite qui infeste le système gastro-intestinal des humains. Jusqu'au présent, le mode d'action des toxines Cry nématocides reste grandement inconnu, sauf que leurs récepteurs spécifiques sont des glycolipides et qu'elles causent des dommages importants aux cellules intestinales. Dans cette étude, on démontre pour la première fois que la toxine nématocide Cry5Ba, membre de la famille des toxines à trois domaines et produite par la bactérie bacille de Thuringe, forme des pores dans les bicouches lipidiques planes en absence de récepteurs. Les pores formés par cette toxine sont de sélectivité cationique, à pH acide ou alcalin. Les conductances des pores formés sous conditions symétriques de 150 mM de KCl varient entre 17 et 330 pS, à pH 6.0 et 9.0. Les niveaux des conductances les plus fréquemment observés diffèrent les uns des autres par environ 17 à 18 pS, ce qui est compatible avec l'existence d'arrangement d'un nombre différent de pores élémentaires similaires, activés de façon synchronisée, ou avec la présence d'oligomères de tailles variables et de différents diamètres de pores.

Mots-clés : bacille de Thuringe, δ -endotoxine nématocide, Cry5Ba, bicouche lipidique plane, formation de pores, électrophysiologie, modélisation par homologie, *C. elegans*.

Abstract

Cry toxins are proteins synthesized as crystal inclusions by the *Bacillus thuringiensis* bacterium upon sporulation. They are used widely as biological control agents, as they exhibit toxicity to a range of invertebrates, including nematodes. The Cry5B toxins are active against a number of parasitic nematode species, such as *Ancylostoma ceylanicum* a human gastrointestinal parasite. So far, the mode of action of nematicidal Cry toxins is largely unknown, except for the facts that their specific receptors are glycolipids and that they cause prominent damage to nematode intestinal cells. In this study, we show for the first time that the nematicidal Cry5Ba toxin, a member of the three domain family of toxins produced by the *Bacillus thuringiensis* forms pores in receptor-free planar lipid bilayers. The pores formed by the toxin were cation selective, both under acid and alkaline pH conditions. Under symmetrical 150 mM KCl conditions, pore activity was characterized by conductances ranging from 17 to 330 pS, at both pH 6.0 and 9.0. The most frequently observed conductance levels differed from each other by approximately 17 to 18 pS consistent with the existence of clusters of different number of elementary, similar, co-operatively gated pores, or with the presence of variable size oligomers with different pore diameters.

Keywords : *Bacillus thuringiensis*, nematicidal δ -endotoxine, Cry5Ba, lipid bilayer membrane, pore formation, electrophysiology, homology modeling, *C. elegans*

Table des matières

Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xiv
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le bacille de Thuringe (<i>Bt</i>).....	2
1.1.1 Inclusions cristallines de <i>Bt</i>	3
1.1.2 Les δ -endotoxines de <i>Bt</i>	5
1.1.2.1 Diversité et classification des δ -endotoxines	5
1.1.2.2 Structure primaire des δ -endotoxines Cry	8
1.1.2.3 Structure tridimensionnelle des δ -endotoxines Cry activées	10
1.2 Mode d'action des toxines Cry	13
1.2.1 Ingestion de l'inclusion cristalline et solubilisation des cristaux.....	14
1.2.2 Activation des protoxines Cry	15
1.2.3 Liaison de toxines Cry aux récepteurs	15
1.2.3.1 Récepteurs APN.....	16
1.2.3.2 Récepteurs CDH	17
1.2.3.3 Récepteur PAL.....	18
1.2.3.4 Récepteurs glycolipides	18
1.2.3.5 Autres récepteurs	19
1.2.3.6 Mécanismes de liaison des toxines Cry aux récepteurs.....	19
1.2.3.7 Régions de liaison des récepteurs	20
1.2.4 Insertion de la toxine et modèle de formation des pores	21
1.2.5 Caractéristiques des pores induits par les toxines Cry.....	25
1.2.5.1 Architecture des pores.....	25

1.2.5.2	Dimensions des pores	26
1.2.5.3	Perméabilités des pores.....	27
1.2.6	Toxicité au niveau cellulaire.....	28
1.2.7	Mécanismes de résistance aux toxines Cry.....	29
1.3	Les nématodes du sol et les géohélmintiasés (GH)	30
1.4	Toxines <i>Bt</i> nématocides	33
1.4.1	Effets toxiques des <i>Bt</i> nématocides	33
1.5	Les protéines Cry5 de <i>Bt</i>	34
1.6	La protéine nématocide Cry5Ba	35
1.6.1	Récepteurs de Cry5Ba.....	35
1.6.2	Effets nématocides de Cry5Ba.....	36
1.6.3	Potentiel thérapeutique et de lutte biologique de Cry5Ba	37
CHAPITRE 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE		38
CHAPITRE 3. MÉTHODES ET MATÉRIELS.....		39
3.1	Bicouches lipidiques planes.....	40
3.2	Montage expérimental	40
3.2.1	Formation de la bicouche.....	42
3.2.2	Reconstitution de la toxine.....	44
3.2.3	Lipides et solutions expérimentales	45
3.2.4	Préparation des coupes de Téflon	45
3.2.5	Fabrication des ponts d'agar-agar.....	46
3.2.6	Modèle électrique de la membrane lipidique.....	47
3.2.7	Acquisition et convention de signe du courant.....	48
3.2.8	Potentiels de jonction et interférences	49
3.3	Enregistrements et analyse de courants ioniques.....	50
3.3.1	Détermination des conductances.....	51
3.3.2	Détermination des relations courant-potentiel (I-V).....	51
3.3.3	Cinétique, probabilité d'ouverture, et sélectivité ionique.....	51
3.3.3.1	Temps d'ouverture et de fermeture.....	51
3.3.3.2	Probabilité d'ouverture	52

3.3.3.3	Sélectivité ionique.....	53
CHAPITRE 4.	RÉSULTATS.....	55
4.1	Modélisation par homologie de la structure 3D de Cry5Ba	55
4.2	Formation de pores par Cry5Ba.....	61
4.3	Propriétés électrophysiologiques des pores à pH 6.0.....	62
4.3.1	Conductances	62
4.3.2	Relations courant-potentiel (I-V).....	72
4.3.3	Cinétique	76
4.3.3.1	Comportement cinétique.....	76
4.3.3.2	Analyse cinétique.....	80
4.3.4	Dépendance au potentiel	82
4.3.5	Sélectivité ionique.....	84
4.4	Propriétés électrophysiologiques des pores à pH 9.0.....	87
4.4.1	Conductances	87
4.4.2	Relation courant - potentiel (I-V)	98
4.4.3	Cinétique	101
4.4.3.1	Comportement cinétique.....	101
4.4.3.2	Analyse cinétique.....	104
4.4.4	Sélectivité ionique.....	106
CHAPITRE 5.	DISCUSSION.....	109
5.1	Formation de pores et effet du pH	109
5.2	Dose active et dose létale.....	112
5.3	Conductances et effet du pH.....	113
5.4	Oligomérisation.....	114
5.5	Cinétique	117
5.6	Sélectivité ionique.....	117
CHAPITRE 6.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	120
BIBLIOGRAPHIE.....		123

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Classification, spécificité et caractéristiques des δ -endotoxines de <i>Bt</i> d'après Höfte et Whiteley (1989).	6
Tableau 4.1. Les conductances correspondant aux sauts de courant les plus souvent observés expérimentalement pour les pores formés par la Cry5Ba en conditions de solutions ioniques symétriques de 150 mM KCl à pH 6.0.	75
Tableau 4.2. Les conductances correspondant à des sauts de courant les plus souvent observées expérimentalement pour les pores formés par la Cry5Ba en conditions de solutions ioniques symétriques de 150 mM KCl à pH 9.0	100

Liste des figures

Figure 1.1. A. Micrographe d'un bacille de Thuringe var. <i>israelensis</i> en phase de sporulation, et B. Microscopie électronique à balayage des cristaux purifiés.....	4
Figure 1.2. Représentation linéaire schématisée d'une toxine typique de la classe Cry1.....	9
Figure 1.3. Structure tridimensionnelle élucidée de la toxine activée Cry1Aa.....	12
Figure 1.4. Représentation schématique de modèle « en parapluie » de la formation de pore par les toxines Cry insecticides.....	23
Figure 3.1. Diagramme simplifié du montage expérimental pour les mesures en BLP	43
Figure 3.2. Schéma simplifié du circuit équivalent de la membrane lipidique perméable aux ions.....	48
Figure 4.1. Alignement des séquences des protéines Cry5Ba et Cry1Aa.....	56
Figure 4.2. Superposition de la structure 3D modèle de Cry5Ba avec la structure 3D élucidée de Cry1Aa .Structure tridimensionnelle élucidée de Cry5Ba activée.....	60
Figure 4.3. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba dans deux bicouches différentes, pour le même potentiel imposé de + 40 mV et en 150 mM KCl à pH 6.0.....	64
Figure 4.4. Histogramme d'amplitude du courant de l'expérience représentée par le tracé B de la Figure 4.3	65
Figure 4.5. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0	68
Figure 4.6. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche qu'en Figure 4.5 , en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0.....	70
Figure 4.7. Tracés des courants ioniques à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0.	71

Figure 4.8. Relation courant-potentiel (I-V) pour les sauts de courant correspondant à la conductance principale que l'on observe sur les tracés présentés à la Figure 4.7 pour tous les potentiels appliqués sur la même bicouche, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0	72
Figure 4.9. Relations courant-potentiel (I-V) des pores formés par la Cry5Ba en solutions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0.....	74
Figure 4.10. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche et pour le même potentiel imposé sur deux bicouches différentes, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0	78
Figure 4.11. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba à + 60 mV, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0.	79
Figure 4.12. Histogrammes des temps de séjours des sauts de courant correspondant à la conductance de 420 pS observée en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0 et à un potentiel de +20 mV	81
Figure 4.13. Tracés de courant enregistrés en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0, illustrant la variation de la probabilité d'ouverture.....	83
Figure 4.14. Tracés de courants ioniques à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés sur la même bicouche en conditions asymétriques de 450/150 mM de KCl à pH 6.0	85
Figure 4.15. Potentiels d'inversion des pores formés par la Cry5Ba en conditions asymétriques de KCl de 450/150 mM (<i>cis/trans</i>) à pH 6.0	86
Figure 4.16. A. Enregistrement de courant à travers les pores formés par la Cry5Ba en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0 et à un potentiel de - 60 mV.	89
Figure 4.17. Enregistrements des courants unitaires dans des bicouches différentes en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0	90
Figure 4.18. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels appliqués à la même bicouche en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0.....	94

Figure 4.19. Courants unitaires des pores formés par la Cry5Ba enregistrés dans deux bicouches différentes soumises à un potentiel de - 20 mV en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0.....	95
Figure 4.20. Tracés des courants ioniques à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0.	96
Figure 4.21. Relation courant-potentiel (I-V) pour les sauts de courant correspondant à la conductance principale que l'on observe sur les tracés présentés à la Figure 4.20 pour tous les potentiels appliqués sur la même bicouche, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0.....	97
Figure 4.22. Relations courant-potentiel (I-V) des pores formés par la Cry5Ba en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0.....	99
Figure 4.23. Tracés des courants unitaires illustrant le comportement cinétique des pores formés par la Cry5Ba en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0.....	103
Figure 4.24. Histogrammes des temps de séjour pour le pore de conductance de 149 pS dont le courant est illustré sur le tracé B à la Figure 4.23 obtenu à -20 mV, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0.....	105
Figure 4.25. Tracés de courants ioniques obtenus à travers les pores formés par la Cry5Ba sur la même bicouche en conditions asymétriques de 450/150 mM de KCl à pH 9.0.....	107
Figure 4.26. Potentiels d'inversion des pores formés par la Cry5Ba en conditions asymétriques de KCl de 450/150 mM (<i>cis/trans</i>) à pH 9.0	108

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
ALP	Alcaline phosphatase
APN	Aminopeptidase N
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
BLP	Bicouche lipidique plane
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bt-R₁</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> Receptor 1
CDH	Cadhérine
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>cry</i>	Gène de <i>Bt</i> codant une protéine cristalline d'inclusion
Cys	Cystéine
<i>cyt</i>	Gène de <i>Bt</i> codant une protéine cytolytique d'inclusion
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
kDa	kiloDalton
GFP	Protéine Fluorescente Verte ou « <i>Green Fluorescent Protein</i> »

GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
nAChR	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NMDG	N-méthyl-D-glucamine
MBB	Membrane à bordure en brosse
MES	Acide 2[N-morpholino] éthanesulfonique
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PEG	Polyéthylène glycol
PFT	Toxine formant de pores ou « <i>Pore Forming Toxin</i> »
RFP	Protéine Fluorescente Rouge ou « <i>Red Fluorescent Protein</i> »
Ser	Sérine
VMBB	Vésicules de la membrane à bordure en brosse
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

Remerciements

En préambule de ce mémoire, je souhaite adresser toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué de différentes façons à sa réalisation. En premier lieu, j'exprime toute ma gratitude à mon directeur de recherche, le Professeur Jean-Louis Schwartz. Je vous adresse, Professeur Schwartz, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et m'avoir fait partager votre profonde expertise scientifique. J'ai eu grand bénéfice à profiter de vos savoirs et de vos conseils rigoureux, ainsi que de vos discussions et commentaires enrichissants et constructifs. Je vous suis très reconnaissante pour tout le soutien, ainsi que la grande disponibilité que vous m'avez accordée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Merci à Marc Juteau pour l'assistance technique au laboratoire. J'exprime aussi toute ma sympathie pour mes collègues Angela, Maxime, et Gabriel pour le véritable plaisir que j'ai eu de les côtoyer et les moments agréables passés en leur compagnie. Je remercie Dr. Vincent Vachon pour nos discussions enrichissantes lors de nos réunions de laboratoire. À mes professeur(e)s et aux membres du GÉPROM et du département de physiologie : je tiens à exprimer à vous tous mes vifs remerciements pour l'ambiance aussi chaleureuse que professionnelle que vous offrez au quotidien. J'exprime surtout mon profond respect et toute ma gratitude aux professeurs Lucie Parent et Jean-Yves Lapointe qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté de juger ce mémoire. Merci aussi aux professeurs Raffi V. Aroian (Université de Californie à San Diego), J. Alex Parker (Université de Montréal et Centre de Recherche-

CHUM) et James D. McGhee (Université de Calgary), pour m'avoir si généreusement fourni la toxine activée Cry5Ba, la souche sauvage et la souche mutante GFP de *C. elegans*, respectivement.

Enfin, un énorme merci pour mes deux fils, Klevi et mon petit bonhomme Jacob, pour l'énorme joie qu'ils apportent dans ma vie et qui m'a permis de surmonter toutes les difficultés. Je dédie ce mémoire à vous deux, mes petits trésors...

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Les pesticides chimiques sont largement utilisés dans la lutte contre les insectes ravageurs nuisibles aux cultures agricoles et forestières, ainsi que les insectes vecteurs de maladies importantes pour les humains. Cependant, la majorité de ces insecticides ne sont pas spécifiques aux ravageurs visés, mais affectent aussi d'autres cultures et organismes. De plus, en tant que produits non dégradables, la plupart des pesticides chimiques persistent dans l'environnement, ce qui fait qu'on retrouve leurs résidus en peu partout dans l'environnement et dans les produits alimentaires (Thurman *et al.*, 1998; Coupe *et al.*, 2000; Leu *et al.*, 2004; Poissant *et al.*, 2008). Cependant, malgré les grands problèmes qu'ils posent pour l'environnement et la santé publique, ils continuent d'être utilisés globalement, représentant environ 95 % des marchés des insecticides. On prévoit une augmentation de leur consommation de 4.1% annuellement jusqu'en 2016 (Keller, 2011). Néanmoins, l'apparition de plus en plus importante de la résistance des insectes ciblés à ces pesticides et la nécessité de développer des méthodes alternatives et moins nocives a conduit à l'utilisation des pesticides biologiques (ou biopesticides) dérivés d'animaux, de bactéries et de minéraux. L'approche biotechnologique a permis de résoudre certains de ces problèmes. Parmi les biopesticides, ceux à base de la bactérie du bacille de Thuringe sont les plus utilisés et constituent actuellement l'approche la plus avantageuse, notamment à cause de leur caractère très sélectif envers les espèces cibles et leur faible toxicité envers les humains et les animaux (Glare et O'Callaghan, 2000; Siegel, 2001). Depuis le début de leur utilisation en 1920, celle-

ci a augmenté et représente aujourd'hui environ 90 % du marché mondial des agents non-chimiques de lutte contre les ravageurs (O'Brien *et al.*, 2009). Leur utilisation contre les insectes vecteurs des maladies humaines, comme la malaria (OMS, 2010), revêt une importance particulière. Plus récemment, l'utilisation des outils modernes de la microbiologie et de l'ingénierie génétique a permis l'introduction commerciale, en 1996, des plantes génétiquement modifiées qui expriment les gènes codant pour la partie active des toxines de *Bt* (ISAAA, 2010). De plus, certaines toxines *Bt* sont des candidates idéales dans la lutte contre certaines espèces de nématodes parasites des humains, des animaux et en agriculture, en particulier à cause leur excellente activité, similaire ou supérieure à celle des agents anthelminthiques (Kotze *et al.*, 2005).

1.1 Le bacille de Thuringe (*Bt*)

Le bacille de Thuringe (ou « *Bacillus thuringiensis* », abrégé en *Bt*), découvert en 1901 par le biologiste japonais Shigetane Ishiwatari, est une bactérie Gram-positive entomopathogène (**Figure 1.1A**), qui produit au cours de la sporulation des inclusions cristallines parasporales constituées d'une ou plusieurs protéines du type Cry (pour cristal) ou Cyt (pour cytolytique) (Garczynski et Siegel, 2007). Ces toxines sont également appelées **δ-endotoxines** afin de les distinguer des autres toxines qui pourraient être produites durant la phase de croissance végétative de la bactérie telles que les protéines végétatives insecticides ou « VIP » (Lee *et al.*, 2003).

La cellule végétative du bacille de Thuringe est en forme de bâtonnet (**Figure 1.1A**), dépourvue de flagelle, de longueur qui varie entre 2 à 5 μm et de largeur d'environ 1 μm (Bulla *et al.*, 1980). La sporulation des bactéries membres de la famille de *Bt* est déclenchée lorsque les conditions environnementales pour une croissance végétative de la bactérie deviennent défavorables (Veening *et al.*, 2009). Chaque bactérie ne produit qu'une seule spore mais une ou plusieurs inclusions cristallines distinctes qui sont toutes libérées lors de la lyse de la bactérie. Le *Bt* est une bactérie ubiquitaire. On le retrouve partout dans le monde et dans une diversité d'écosystèmes (Damgaard, 2000; Hongyu *et al.*, 2000; Kaelin et Gadani, 2000; Maduell *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2005; González *et al.*, 2011). En fait, le bacille de Thuringe fait partie du groupe *cereus* des bacilles, qui compte six membres très proches génétiquement, mais possédant des phénotypes et des effets pathogènes très différents (Gohar *et al.*, 2005): *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Bacillus mycoides* (*Bm*), *Bacillus pseudomycoides* (*Bp*) et *Bacillus weihenstephanensis* (*Bw*).

1.1.1 Inclusions cristallines de *Bt*

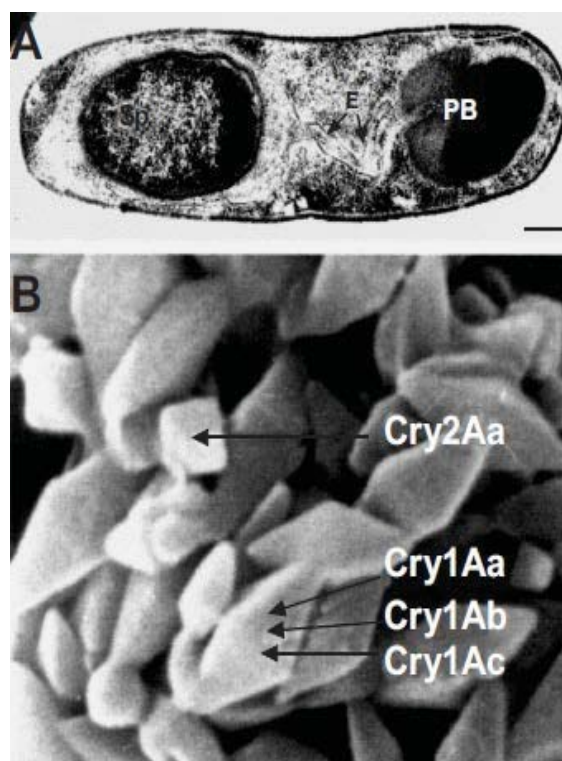
Les inclusions cristallines produites par le bacille de Thuringe présentent environ 25 % de son poids sec et possèdent un contenu de 95% de protéines, le reste étant des glucides (Lecadet et Dedonder, 1971). Elles sont insolubles en solution aqueuse à pH neutre ou acide (Bulla *et al.*, 1980). Les cristaux constituant les inclusions possèdent plusieurs morphologies (**Figure 1.1B**) : pyramidales, bipyramidales, cuboïdes, sphériques ou amorphes (Federici *et al.*, 2010; Herández-Fernández *et al.*, 2011) et peuvent être aussi grandes que 1 μm (Bechtel

et Bulla, 1976; Feng *et al.*, 2001; Federici *et al.*, 2010) et **Figure 1.1B**. La toxicité insecticide spécifique de la souche bactérienne est liée à la morphologie des cristaux (Mikkola *et al.*, 1982; Feng *et al.*, 2001). Chaque type de cristal peut contenir une ou plusieurs δ -endotoxines (**Figure 1.1B**). Ces dernières sont liées par une série d'interactions, telles que les liaisons hydrogène, les ponts disulfure et l'hydrophobicité (Bulla *et al.*, 1980; Choma et Kaplan, 1990, 1992; Aronson, 1993). Le contenu des δ -endotoxines varie selon la souche bactérienne.

Figure 1.1. (d'après Federici *et al.* (2010))

A. Micrographe d'un bacille de Thuringe var. *israelensis* en phase de sporulation, et de production de la spore (Sp) ainsi que de l'inclusion cristalline parasporale (PB) contenant des protéines insecticides.

B. Microscopie électronique à balayage des cristaux purifiés produits par la souche *Bt* var. *kurtsaki* HD-1. Les flèches noires indiquent les protéines Cry trouvées dans ces cristaux. Ces protéines sont toxiques pour les larves de lépidoptères. La barre d'échelle représente une dimension approximative de 0.3 μ m dans les panneaux A et B.



1.1.2 Les δ -endotoxines de *Bt*

Les δ -endotoxines cristallines de *Bt* sont codées par un ou plusieurs gènes localisés dans les plasmides d'ADN et dans l'ADN chromosomique de la bactérie. La taille de ces plasmides varie selon la sous-espèce et le sérotype (Rolle *et al.*, 2005).

1.1.2.1 Diversité et classification des δ -endotoxines

Le clonage et le séquençage des premiers gènes *cry* ont été réalisés par Schnepf et Whiteley (1981) et Held *et al.* (1982). Depuis, les séquences nucléotidiques de plus que 400 gènes *cry* ont été rapportées. Höfte et Whiteley (1989) furent les premiers à proposer un système de classification de la vaste diversité des δ -endotoxines basé sur le degré d'homologie de leurs séquences en acides aminés, ainsi que sur leur spectre d'activité insecticide. Il en résulte deux familles principales de protéines désignées « Cry » et « Cyt » (**Tableau 1.1**). La famille des protéines Cry se divise, selon le spectre d'activité insecticide, en quatre grandes classes : I- Lépidoptères ; II- Lépidoptères et diptères ; III-Coléoptères ; IV-Diptères. Deux nouvelles classes actives contre les nématodes, CryV (CryVA(a), CryVA(b), CryVB, CryVC) et CryVI (CryVIA, CryVIB), ont été ajoutées plus tard, ainsi que plusieurs nouveaux gènes appartenant aux classes précédemment définies, telles que CryIF, CryIG, CryIIIB, CryIIIC, CryIIID, et CryIIIE (Feitelson *et al.*, 1992). Toutes ces classes ont par la suite été divisées en plusieurs sous-classes, selon leur degré d'identité de séquences primaires. Par exemples, les toxines CryIA(a), CryIA(b), et CryIA(c) appartenant à la sous-classe CryIA partagent une homologie de séquence de 80 %.

Tableau 1.1. Classification, spécificité et caractéristiques des δ -endotoxines de *Bt* d'après Höfte et Whiteley (1989).

δ-Endotoxines	Poids moléculaire de la protoxine (kDa)	Ordre d'insectes cibles *	Souches représentatives de Bt	Structure typique des cristaux
CryI{ A (a), (b), (c), B, C, D}	131-138	L	<i>kurstaki</i> HD-1 <i>thuringiensis</i> HD-2 <i>berliner</i> 1715, <i>aizawai</i> , <i>sotto</i> , <i>entomocidus</i>	Bipyramidale
CryII (A, B)	71	L/D	<i>kurstaki</i> HD-1, HD-263	Cuboïde
CryIIIA	73	C	<i>san diego</i> <i>tenebrionis</i> , <i>EG2158</i>	Plat/ Rhomboédrique
CryIVA, B, C, D	72-135	D	<i>israelensis</i>	Cylindrique Sphérique Bipyramidale
CytA	27	D/ cytolytique non- spécifique	<i>israelensis</i> <i>morrisoni</i> PG 14	Sphérique

* L : Lépidoptères ; C : Coléoptères ; D : Diptères

De nouvelles δ -endotoxines ont été régulièrement identifiées nécessitant qu'une nouvelle nomenclature, basée uniquement sur l'identité des séquences soit établie, comme

proposé par Crickmore *et al.* (1995). Elle reflète le degré de parenté et de divergence évolutive des gènes codant pour les δ -endotoxines. Dans cette nomenclature, les chiffres romains sont remplacés par des chiffres arabes et les parenthèses sont éliminées. Ainsi, le CryIA(a) devient Cry1Aa. Un nom unique est attribué à chaque nouvelle toxine, intégrant quatre rangs, par exemple Cry23Aa1. Les limites d'identités des séquences utilisées pour la classification des nouveaux gènes sont de 45 %, 75 % et 95 % suivant le rang. Une identité entre 45 % et 75 % apporte une nouvelle lettre majuscule au deuxième rang, tandis que 75 % à 95% apporte une nouvelle lettre minuscule au troisième rang ; un quatrième chiffre est ajouté pour tenir compte des gènes allèles (identité de séquence > 95 %). Plusieurs toxines Cry ont été renommées dans le cadre du nouveau système. Ainsi, le CryIVC et CryIVD sont devenues Cry10A et Cry11A, respectivement. Dans notre étude, la nouvelle nomenclature sera utilisée, à l'exception des citations où l'ancienne nomenclature a été utilisée.

Les effets toxiques des toxines Cry ont aussi été observés chez d'autres membres de plusieurs phyla d'invertébrés, tels que les nématodes et les protozoaires (Schnepf *et al.*, 1998).

Les toxines Cyt sont principalement spécifiques aux larves des diptères. Des gènes *cyt* ont été aussi identifiés dans des souches actives contre des lépidoptères et coléoptères. Elles présentent aussi une activité cytolytique contre une variété de cellules d'invertébrés et vertébrés ainsi que certaines cellules de mammifères (Schnepf *et al.*, 1998).

La liste actuelle de gènes des δ -endotoxines va des groupes des classes Cry1Aa1 à Cry70Aa et de Cyt1 à Cyt3 (Crickmore *et al.*, 2012).

1.1.2.2 Structure primaire des δ -endotoxines Cry

Les inclusions cristallines de *Bt* sont constituées de δ -endotoxines synthétisées en tant que protoxines inactives. Leur effet toxique est attribué à leur forme active obtenue par protéolyse dans la lumière intestinale des insectes cibles. La structure primaire des δ -endotoxines varie selon les gènes qui les encodent et les séquences des protoxines de *Bt* sont de tailles différentes, atteignant un maximum d'environ 1250 acides aminés pour les protoxines Cry et 250 pour les Cyt. Une représentation linéaire schématisée d'une protoxine typique de la classe Cry1 est illustrée à la **Figure 1.2**. Les séquences des protoxines du type Cry1, les mieux caractérisées, montrent une organisation en deux régions (**Figure 1.2**) : une région toxique localisée dans la moitié N-terminale de la protoxine et une région structurale située dans la partie C-terminale (Höfte et Whiteley, 1989). En dépit de leur diversité, presque toutes les toxines Cry activées possèdent cinq blocs de séquences d'acides aminés hautement conservés (Schnepf *et al.*, 1998) ainsi qu'une région hydrophobe (H) située au niveau des premiers 120 acides aminés de la région N-terminale (Höfte et Whiteley, 1989). Ces blocs sont illustrés schématiquement dans la **Figure 1.2**. Les protoxines Cry ayant plus de 1000 acides aminés possèdent dans la région C-terminale trois blocs conservés supplémentaires (blocs 6, 7 et 8, **Figure 1.2**).

La partie structurale C-terminale est la région la plus conservée mais n'est pas essentielle pour la toxicité. En tant que région très riche en cystéines (de 1.1 à 1.9 % permettant la formation de 7 à 12 ponts disulfure), elle contribue à l'assemblage, la cristallisation, la stabilité et l'insolubilité du cristal (Höfte et Whiteley, 1989; Bietlot *et al.*, 1990; Gill *et al.*, 1992). La réduction des ponts disulfure mène à la solubilisation de

l'inclusion parasporale cristalline qui, pour la plupart des protoxines Cry, se produit à un pH alcalin dans l'intestin de l'insecte. Les protoxines solubilisées sont ensuite converties par protéolyse en toxines activées (**Figure 1.2**).

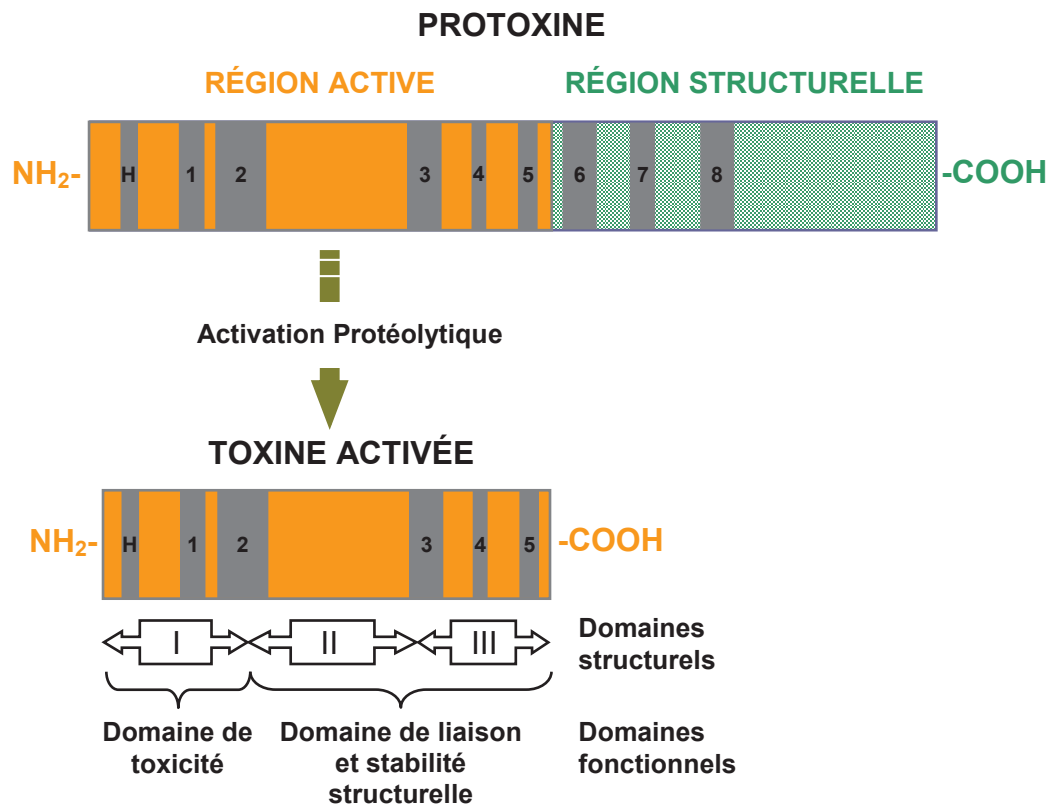


Figure 1.2. Représentation linéaire schématisée d'une toxine typique de la classe Cry1. Les blocs de séquence conservés parmi les toxines Cry sont représentés par les rectangles en gris.

Le clivage protéolytique des protoxines implique au moins deux sites conservés : un site dans la région N-terminale qui résulte dans le clivage d'environ 25 à 60 acides aminés pour les toxines Cry1, Cry2, Cry3, et un deuxième site de clivage qui résulte en la coupure de la moitié de la protoxine dans sa partie C-terminale dans le cas des protoxines longues

(Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2003) (**Figure 1.2**). Pour les toxines Cry1A activées, la région toxique se trouve généralement dans la région limitée par les acides aminés 29 à 35 du côté N-terminal et 599 à 609 du côté C-terminal. La protéolyse convertit les protoxines de masse moléculaire 130-140 kDa en fragments toxiques typiquement de 60-70 kDa et résistants aux protéases (Schnepf et Whiteley, 1985; Höfte *et al.*, 1986).

1.1.2.3 Structure tridimensionnelle des δ -endotoxines Cry activées

La première structure tri-dimensionnelle d'une toxine *Bt* activée, le Cry3A, fut résolue par cristallographie aux rayons X en 1991 (Li *et al.*, 1991). Depuis, les structures cristallines de sept autres toxines Cry sont disponibles : Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Bb1 (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005), et Cry8Ea1 (Guo *et al.*, 2009). Ces structures ont une organisation tridimensionnelle très semblable qui consiste en un repliement en trois domaines structuraux tel qu'illustré dans la **Figure 1.3** pour la toxine Cry1Aa. Le **domaine I** est situé dans la portion N-terminale. Il comporte un ensemble de sept hélices α (avec l'hélice 2 constituée de deux petites hélices $\alpha 2a$ et $\alpha 2b$), dont six sont amphipathiques et entourent l'hélice 5. Cette dernière est hydrophobe et placée au centre du domaine I. Ce domaine s'étend du résidu 33 au résidu 253 et comporte le bloc 1 (qui englobe l'hélice 5), ainsi qu'une partie du bloc 2 qui inclut la moitié de l'hélice 6, l'hélice 7 au complet et le premier feuillet β du domaine II (Grochulski *et al.*, 1995). Le domaine I est responsable de la toxicité par son insertion dans la membrane et la formation des pores ou canaux transmembranaires (Gazit et Shai, 1993; Walters *et al.*, 1993; Von Terssch *et al.*, 1994;

Aronson *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997a; Aronson *et al.*, 1999; Rang *et al.*, 2001; Vachon *et al.*, 2004b; Girard *et al.*, 2008; Girard *et al.*, 2009a; Girard *et al.*, 2009b; Lebel *et al.*, 2009).

Le **domaine II** (**Figure 1.3**) est la région la plus variable parmi les toxines Cry. Pour la Cry1Aa, il s'étend entre les résidus 265 et 461 et se compose de trois feuillets β antiparallèles de quatre brins chacun, formant une structure connue sous le nom de prisme β ou de motif en clé grecque, avec des régions possédant des boucles exposées au solvant, ainsi que deux très petites hélices α (Grochulski *et al.*, 1995). Le domaine II est impliqué dans la sélectivité de la toxine, qui est déterminée par la reconnaissance et la liaison aux récepteurs spécifiques se situant dans la membrane apicale des cellules intestinales des insectes cibles (Winder et Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991; Gill *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1994; Rajamohan *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2003). Le domaine II joue un rôle primordial dans la liaison aux récepteurs. Par exemple, Lu *et al.* (1994) ont démontré que la substitution ou la suppression des résidus 365-371 de la toxine Cry1Aa menait à la perte presque complète de la toxicité de la toxine pour l'insecte *Bombyx mori* (ver à soie). En fait, les sélectivités différentes des toxines Cry ont été associées à la variabilité observée dans le domaine II de ces toxines.

Le **domaine III** (**Figure 1.3**) se situe dans la région C-terminale de la toxine activée et est constitué de deux feuillets β antiparallèles imbriqués dans une structure décrite comme un sandwich β . Pour la Cry1Aa, il s'étend entre les résidus 463 et 609. C'est le domaine le plus conservé où sont localisés les blocs 3, 4 et 5. Des études ont suggéré que ce domaine joue aussi un rôle dans la reconnaissance et la liaison des toxines à leurs récepteurs spécifiques (Chen *et al.*, 1993; Bosch *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1994; Aronson *et al.*, 1995; Lee *et al.*,

1995; de Maagd *et al.*, 1996a; de Maagd *et al.*, 1996b; Schwartz *et al.*, 1997c; Lee *et al.*, 1999; de Maagd *et al.*, 2000; Samir *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2002).

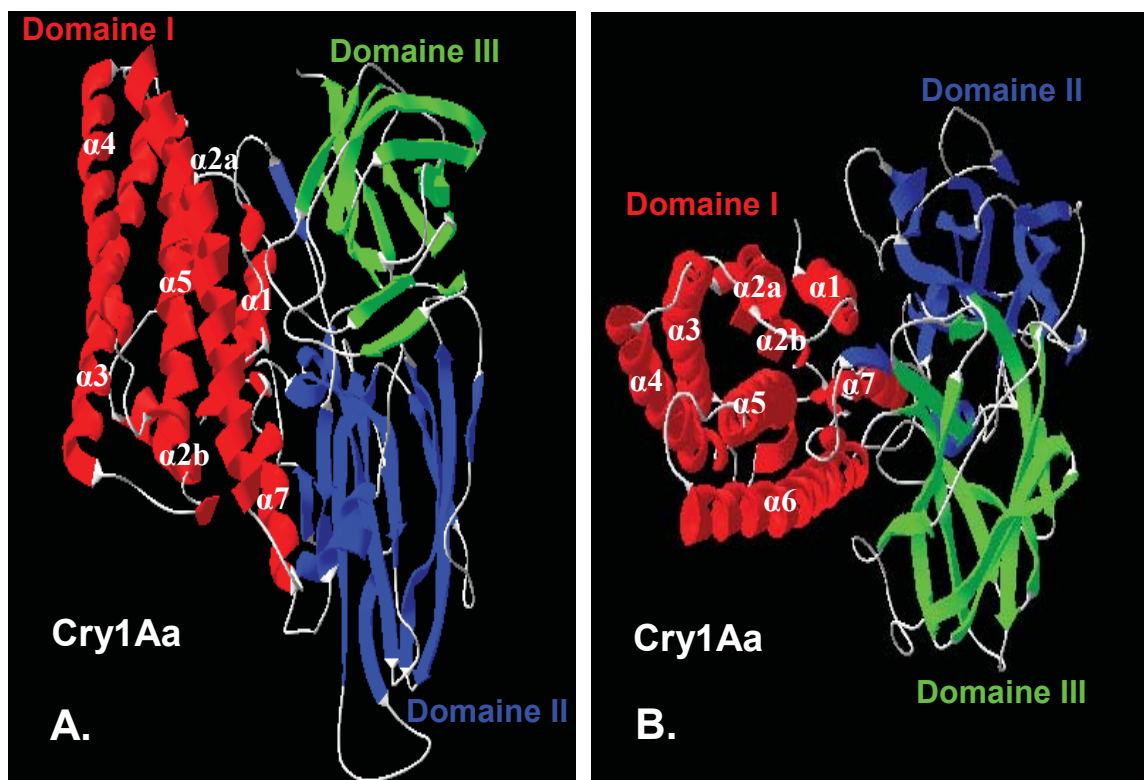


Figure 1.3. Structure tridimensionnelle élucidée de la toxine activée Cry1Aa, en vue latérale (A) et de dessus (B), résolue à 2.25 Å par diffraction des rayons X (Grochulski *et al.*, 1995). Le Domaine I (en rouge) possède sept hélices α , le Domaine II (en bleu) trois feuilletts β antiparallèles, et le Domaine III (en vert) deux feuilletts β antiparallèles en forme de sandwich.

Par exemple, Schwartz *et al.* (1997c) ont démontré que des mutations faites au niveau des arginines du bloc 4 de la toxine CryIAa réduisent de façon considérable la conductance des canaux formés en BLP suggérant l'implication du domaine III dans la toxicité de CryIAa. Des mutations similaires faites sur Cry1Ac causent une très forte réduction de la toxicité sur les cellules Cf1 de la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana* et les

larves de la teigne des crucifères *Plutella xylostella* (Masson *et al.*, 2002). La mutation des Ser503 et Ser504 du domaine III de Cry1Ac réduit la toxicité de la toxine pour *Manduca sexta* ainsi que son affinité de liaison aux vésicules de la membrane à bordure en brosse (VMBB) de l'intestin de l'insecte (Aronson *et al.*, 1995).

1.2 Mode d'action des toxines Cry

Les propriétés insecticides des toxines de *Bt* résident dans leur capacité d'intoxiquer les larves des insectes susceptibles. En dépit de différences observées dans leurs séquences et leurs spectres insecticides, un grand nombre de toxines Cry à trois domaines possèdent une mode d'action très similaire. Cependant, malgré l'avancement des connaissances dans l'élucidation exacte de leur mode d'action, le mécanisme précis et complet d'intoxication reste encore à clarifier. Jusqu'au présent, leur mode d'action a été caractérisé principalement chez les insectes lépidoptères et pour les toxines appartenant à la famille Cry1A, de grande importance commerciale. Les études faites ont bien démontré que la cible primaire des toxines Cry sont les cellules épithéliales en colonne de l'intestin moyen larvaire de l'insecte (Heimpel et Angus, 1959; Hofmann et Lüthy, 1986; Rodrigo-Simón *et al.*, 2008). Plusieurs hypothèses ont été proposées au fil des années. Le mécanisme d'action généralement accepté fait l'objet de plusieurs articles de synthèse (Knowles et Ellar, 1987; Gill *et al.*, 1992; Honée et Visser, 1993; Vadlamudi *et al.*, 1993; Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2003; Upadhyay, 2003; Bravo *et al.*, 2007; Federici *et al.*, 2010; Vachon *et al.*, 2012). C'est un mécanisme composé d'une cascade d'événements multiples qui comporte plusieurs étapes : 1) l'ingestion de l'inclusion cristalline par l'insecte; 2) la dissolution du cristal par le pH alcalin

du suc intestinal et la libération des protoxines de différentes longueurs; 3) la formation de la toxine activée résultant de la solubilisation de la protoxine par le pH alcalin intestinal et son activation par des protéases intestinales; 4) la liaison de la toxine activée à ses récepteurs spécifiques qui se trouvent à la surface apicale des cellules épithéliales en colonne de l'intestin moyen; 5) l'insertion de la toxine et la formation de pores dans la membrane apicale des cellules épithéliales qui mènent à l'abolition des gradients ioniques et électriques transmembranaires, ainsi que de l'équilibre osmotique; 6) enfin, la lyse osmotique colloïdale des cellules épithéliales et la mort subséquente de l'insecte (voir section 1.2.6).

Le mécanisme d'action des toxines Cyt est différent. Celles-ci interagissent directement avec les lipides membranaires et la destruction de la membrane cellulaire se fait soit via la formation des pores, soit par un effet détergent (Butko, 2003).

1.2.1 Ingestion de l'inclusion cristalline et solubilisation des cristaux

Les protéines Cry ne sont toxiques que lorsque les cristaux parasporaux sont ingérés par les larves des insectes cibles et l'ingestion sous la forme d'inclusion cristalline, de protoxine ou de toxine activée a le même effet sur les insectes hôtes (van Frankenhuyzen, 2009). La dissolution des inclusions cristallines et la libération des protoxines nécessite le clivage des ponts disulfures (Bietlot *et al.*, 1990), ce qui se produit sous l'effet des pH extrêmes de l'intestin moyen des insectes cibles, fortement alcalin chez les larves lépidoptères et les diptères, et fortement acides chez celles de coléoptères (Prieto-Samsónov *et al.*, 1997). Certaines inclusions cristallines se solubilisent seulement à une valeur de pH spécifique et le

manque de solubilisation du cristal a été directement relié à l'absence de toxicité (Aronson *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1994; McGaughey, 1994).

1.2.2 Activation des protoxines Cry

La dissolution du cristal dans le milieu fortement alcalin de l'intestin des insectes ciblés mène à la libération de la protoxine, suivie par sa digestion protéolytique produisant ainsi la toxine activée. Les protoxines *Bt* libérées suite à la solubilisation du cristal sont hydrolysées dans leur forme activée par des protéases (de type sérine) présentes dans l'intestin des larves des insectes cibles (Höfte et Whiteley, 1989; Terra et Ferreira, 1994; Oppert *et al.*, 1996; Pang *et al.*, 1999). Il a été démontré qu'une protoxine peut devenir active contre une larve lépidoptère ou diptère selon les protéases utilisées pour son activation. Par exemple, lorsque la forme solubilisée de la protoxine de 130 kDa de *Bt* var. *aizawai* est activée avec le suc intestinal de lépidoptère *Pieris brassicae*, la toxine activée tue *P. brassicae* et le diptère *Aedes aegypti*. En revanche, quand l'activation a été faite avec le suc intestinal de *A. aegypti*, la toxine activée tue seulement ce dernier (Knowles *et al.*, 1986).

1.2.3 Liaison de toxines Cry aux récepteurs

Les toxines Cry activées diffusent à travers la membrane péritrophique qui couvre l'épithélium de l'intestin des lépidoptères (Whalon et Wingerd, 2003). Par la suite, il est généralement établi que l'intoxication par ces toxines implique leur reconnaissance et leur liaison à des récepteurs spécifiques (protéines membranaires) situés à la surface de la membrane en bordure en brosse (MBB) des cellules épithéliales en colonne de l'intestin

moyen des insectes cibles. Pour les toxines Cry1, les plus étudiées, plusieurs protéines ont été identifiées comme récepteurs : des aminopeptidases de type N (ou APN) à ancrage GPI (glycosylphosphatidylinositol), des récepteurs de type cadhérine calcium-dépendante (ou CDH), une phosphatase alcaline (ou PAL) à ancre GPI, une protéine glycoconjuguée BT-R₂₇₀ de 270 kDa, et une protéine de 252 kDa.

1.2.3.1 Récepteurs APN

Les récepteurs APN constituent la première classe de récepteurs identifiés chez les lépidoptères. Chez ces derniers, l'APN est une protéine membranaire ancrée à l'épithélium de l'intestin par l'intermédiaire de sa région C-terminale par un GPI (Wang *et al.*, 2005). Plusieurs isoformes d'APN de poids moléculaires variant de 90 à 170 kDa ont été identifiées comme récepteurs de toxines Cry1 qui ont été divisés en cinq classes phylogénétiques, selon leurs caractéristiques structurales et de liaisons aux toxines Cry (Herrero *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2006; Pigott et Ellar, 2007).

Le premier récepteur APN a été localisé dans la membrane apicale en bordure en brosse de *M. sexta* pour la toxine Cry1Ac (Knight *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1995). Il s'agit d'une protéine de 120 kDa de la classe APN1. Cette protéine lie aussi spécifiquement les Cry1Ac chez la spongieuse *Lymantria dispar* (Valaitis *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 2000) et la tordeuse des bourgeons du tabac, *Heliothis virescens* (Gill *et al.*, 1995). Il existe plusieurs possibilités de liaison. D'une part, une toxine peut se lier à différents types de récepteurs. Ainsi, pour la toxine Cry1Ac, deux autres récepteurs APN1 de poids moléculaires de 170 kDa (Luo *et al.*, 1997) et 110 kDa (Banks *et al.*, 2003) ont été identifiés chez le lépidoptère *H.*

virescens. Pour la Cry1C, le récepteur chez *M. sexta* est une APN1 de 106 kDa (Luo *et al.*, 1996) et un récepteur APN1 pour Cry1C a aussi été identifié chez *Bombyx mori* (Yaoi *et al.*, 1997). D'autre part, un type de récepteur peut lier différentes toxines. Par exemple, en utilisant l'analyse par biocapteur optique, Masson *et al.* (1995) ont démontré que les toxines Cry1Aa, Cry1Aab, et Cry1Ac se lient au même récepteur APN de 120 kDa de *M. sexta* avec la Cry1Ac se liant à deux sites différents et ayant des affinités différentes. De plus, des récepteurs APN1 et un APN3 pour les toxines Cry1A ont été identifiés chez *P. xylostella* (Luo *et al.*, 1997b; Nakanishi *et al.*, 2002). Des récepteurs du type APN3 pour les Cry1A ont été identifiés chez d'autres insectes comme chez la noctuelle de la tomate *Helicoverpa armigera* (Rajangopal *et al.*, 2003), chez *Lycaena dispar* (Valaitis *et al.*, 1995; Valaitis *et al.*, 2001) et chez *B. mori* (Shitomi *et al.*, 2006).

Des toxines Cry spécifiques pour les diptères se lient aussi à des récepteurs APN. Ainsi, deux récepteurs APN de 100 kDa (APN_{Anq}100) et 106 kDa (AgAPN2) ont été identifiés pour la toxine Cry11Ba chez les moustiques *Anopheles quadrimaculatus* (Abdullah *et al.*, 2006) et *Anopheles gambiae* (Zhang *et al.*, 2008), respectivement.

1.2.3.2 Récepteurs CDH

Les cadhérines sont des protéines d'adhésion calcium-dépendantes qui constituent une grande famille de glycoprotéines transmembranaires (Angst *et al.*, 2001). Le premier récepteur de type CDH, le *Bt-R*₁, a été identifiée par immunoprécipitation et électrophorèse bidimensionnelle à partir des membranes à bordure en brosse (MBB) de l'intestin moyen de *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1993). Cette protéine de 210 kDa lie spécifiquement et à haute

affinité les toxines de la famille Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac) (Keeton et L. A. Bulla Jr., 1997). Chez *B. mori*, ce type de récepteurs est une protéine de 175 kDa, le *BT-R₁₇₅*, partageant une homologie de séquence de 69.5 % avec le *Bt-R₁* (Nagamatsu *et al.*, 1998; Nagamatsu *et al.*, 1999). Des récepteurs de type CDH ont aussi été identifiés chez d'autres insectes pour les toxines Cry1A, tels que ceux de la souche *H. virescens* -YHD2 (Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Flannagan *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2008).

1.2.3.3 Récepteur PAL

Les phosphatases alcalines (PAL) sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des groupements phosphates de nombreuses molécules, y compris les protéines. Des récepteurs PAL à ancras GPI ont été observés chez quelques espèces : chez *H. virescens*, une glycoprotéine de 68 kDa pour la Cry1Ac (Jurat-Fuentes et Adang, 2004) et une protéine de 65 kDa pour la Cry1Ac (McNail et Adang, 2003), et chez le diptère *A. Aegypti* une autre protéine de 65 kDa pour la Cry1Aa (Fernandez *et al.*, 2006).

1.2.3.4 Récepteurs glycolipides

Des glycosphingolipides dans les cellules intestinales de nématodes *C. elegans* ont été identifiés comme récepteurs de la toxine Cry5Ba qui fait l'objet de cette présente étude (Griffits *et al.*, 2005). Ces récepteurs sont décrits dans la section 1.6.1. La liaison des toxines insecticides Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac aux glycolipides extraits de l'intestin moyen de *M. sexta* a aussi été décrite (Griffits *et al.*, 2005) suggérant que ce type de récepteurs pourrait bien représenter une classe de récepteurs pour ces toxines.

1.2.3.5 Autres récepteurs

Une protéine glycoconjuguée de 270 kDa, le *Bt-R₂₇₀*, fut identifiée dans les membranes en bordure en brosse de la spongieuse *L. dispar*. Elle se lie avec une haute affinité aux toxines Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac (Valaitis *et al.*, 2001). Un récepteur putatif de 252 kDa (P252) a été isolé dans les MBB de *B. mori* pour ces toxines (Hossain *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2007; Pandian *et al.*, 2008). Plus récemment, un autre récepteur putatif (ABCC2) appartenant à la classe des transporteurs ABC et qui lie la toxine Cry1Ac chez le *H. virescens* a été identifiée (Gahan *et al.*, 2010).

1.2.3.6 Mécanismes de liaison des toxines Cry aux récepteurs

Une espèce de lépidoptère peut posséder un ou plusieurs types de récepteurs. Ainsi, chez *M. sexta*, on trouve des récepteurs APN, APL et BT-R₁ pour les toxines Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac (Chen *et al.*, 2005). Une toxine peut avoir aussi plusieurs sites de liaisons (Van Rie *et al.*, 1989; Wolfersberger, 1990; Masson *et al.*, 1995). De plus, la même toxine peut se lier avec différentes affinités aux différents récepteurs. Par exemple, la Cry1Ab se lie au récepteur *Bt-R₁* de 210 kDa de *M. sexta* avec une affinité d'environ 1 nM alors qu'elle se lie au récepteur APN de *M. sexta* avec une affinité de 100 nM (Vadlamudi *et al.*, 1995). Chez *Helicoverpa armigera*, les deux récepteurs APN (HAAPN1 et HAAPN2) possèdent différentes affinités pour les toxines Cry1A (Rajangopal *et al.*, 2003). D'autre part, les toxines Cry1Aa et Cry1Ab pourraient reconnaître le même site de liaison sur un récepteur APN de *M. sexta*, alors que chez cet insecte la Cry1Ac se lie à deux sites différents du récepteur commun

(Masson *et al.*, 1995). Chez les lépidoptères *Salix exigua* et *Spodoptera litura* l'absence du récepteur rend ces insectes résistants aux toxines Cry1C et Cry1Ac1 (Rajogopal *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2005). Des expériences en microscopie à force atomique des VMBB de *M. sexta* insérées en BLP (Laflamme *et al.*, 2008) ont montré la formation des complexes toxines-récepteurs pour Cry1Aa, Cry1Ac et Cry1C actives pour *M. sexta*, alors qu'aucune interaction spécifique n'est observée pour Cry1Ba qui est inactive pour cet insecte. La liaison des toxines aux récepteurs semble complexe et cela, à plusieurs niveaux. Par exemple, d'une part la liaison de la toxine à son récepteur n'implique pas nécessairement une toxicité *in vivo* (Hofmann et Lüthy, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a; Chen *et al.*, 1995). D'autre part, une corrélation négative entre la liaison aux récepteurs et la toxicité a aussi été observée (Wolfersberger, 1990; Garczynski *et al.*, 1991; Jenkins *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1999). La liaison au récepteur et la diminution du nombre ou de l'affinité des sites récepteurs sont considérées comme des facteurs majeurs du maintien de la cascade toxique des toxines Cry (Pigott et Ellar, 2007).

1.2.3.7 Régions de liaison des récepteurs

L'interaction des membres de la famille Cry1A avec leurs récepteurs spécifiques implique un ou plusieurs sites ou épitopes de récepteurs, et une ou plusieurs régions des domaines II et III (Masson *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 2007; Pigott et Ellar, 2007; Feil *et al.*, 2010; Soberon *et al.*, 2010). Il a été démontré, par exemple, que des mutations des arginines (368-369) au niveau de la boucle 2 de domaine II de la toxine Cry1Ac toxique pour *M. sexta* et *L. dispar* réduisent considérablement sa liaison aux récepteurs APN chez ces deux insectes,

ainsi que la toxicité (Lee *et al.*, 2000). Différentes régions du domaine III sont aussi impliquées dans la liaison aux récepteurs APN. Par exemple, le domaine III de la toxine Cry1Ac reconnaît une région acétylgalactosamine-N (GalNAc) du récepteur APN1 de *M. sexta* (Masson *et al.*, 1995; Valaitis *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 2000). Au moins trois épitopes de liaison ont été identifiés dans le récepteur CDH de *M. sexta* pour le domaine II de toxines Cry1A (Dorsch *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2004). Des régions similaires ont été identifiées chez *H. virescens* (Xie *et al.*, 2005) et *B. mori* (Atsumi *et al.*, 2008). Pour le récepteur ALP (HvALP) de 68 kDa de *H. virescens*, des oligosaccharides-N contenant la région GalNAc ont été identifiés (Jurat-Fuentes et Adang, 2004). D'autres sites spécifiques de liaison ont été prédits pour le récepteur Ha-ALP chez *H. armigera* et la toxine Cry1Ac (Shan *et al.*, 2011). Le domaine III est aussi impliqué dans la liaison de la toxine Cry1Ac au récepteur APL (Burton *et al.*, 1999).

1.2.4 Insertion de la toxine et modèle de formation des pores

Avec l'identification d'un grand nombre de récepteurs ainsi que d'une grande variété de toxines Cry, le mécanisme d'action de ces dernières n'est toujours pas complètement élucidé. Plusieurs modèles et hypothèses, faisant parfois l'objet de controverse, ont été proposés au fil des années, quant à l'origine et aux mécanismes de la toxicité des toxines Cry (Bravo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Jurat-Fuentes et Adang, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2008). Cependant, le modèle de formation de pores lytiques proposé par Knowles et Ellar (1987), connu sous le nom de modèle en parapluie, reste le plus plausible. Tous les autres modèles ont fait l'objet de critiques (Vachon *et al.*, 2012), puisque les preuves

qualitatives accumulées viennent essentiellement à l'appui du modèle en parapluie, dit « classique », de formation des pores selon Knowles et Ellar (1987). Selon ce modèle (**Figure 1.4**), la liaison de la toxine se fait selon un mode bi-séquentiel. D'abord, les champs électrostatiques font en sorte que les domaines II et III approchent le récepteur, lorsque domaine I reste plus éloigné du récepteur. Le domaine II de la toxine reconnaît le site récepteur et se lie à ce dernier, ce qui entraîne un changement de conformation de la toxine. Le domaine III pourrait initialement se lier à la membrane et initier la liaison de domaine II à son récepteur (Jenkins *et al.*, 2000). Le rôle du domaine III ne pourrait cependant être généralisé puisque c'est le domaine le moins conservés parmi les toxines Cry (Agrawal *et al.*, 2006). La réorganisation structurale de la toxine après la liaison de domaine II lui permet de présenter à la membrane la structure hydrophobe en épingle à cheveux formée par les hélices 4 et 5 du domaine I (le manche du parapluie ouvert). L'épingle à cheveux d'un monomère s'insère ensuite de façon irréversible dans la membrane. L'oligomérisation des monomères mène à la formation des pores lytiques. Les autres hélices du domaine I ainsi que les domaines II et III s'étalent à la surface de la membrane, formant ainsi la toile du parapluie ouvert. On considère que le récepteur est ensuite libéré de la toxine, une fois celle-ci insérée dans la membrane (Knowles et Ellar, 1987; Schwartz *et al.*, 1997a; Masson *et al.*, 1999).

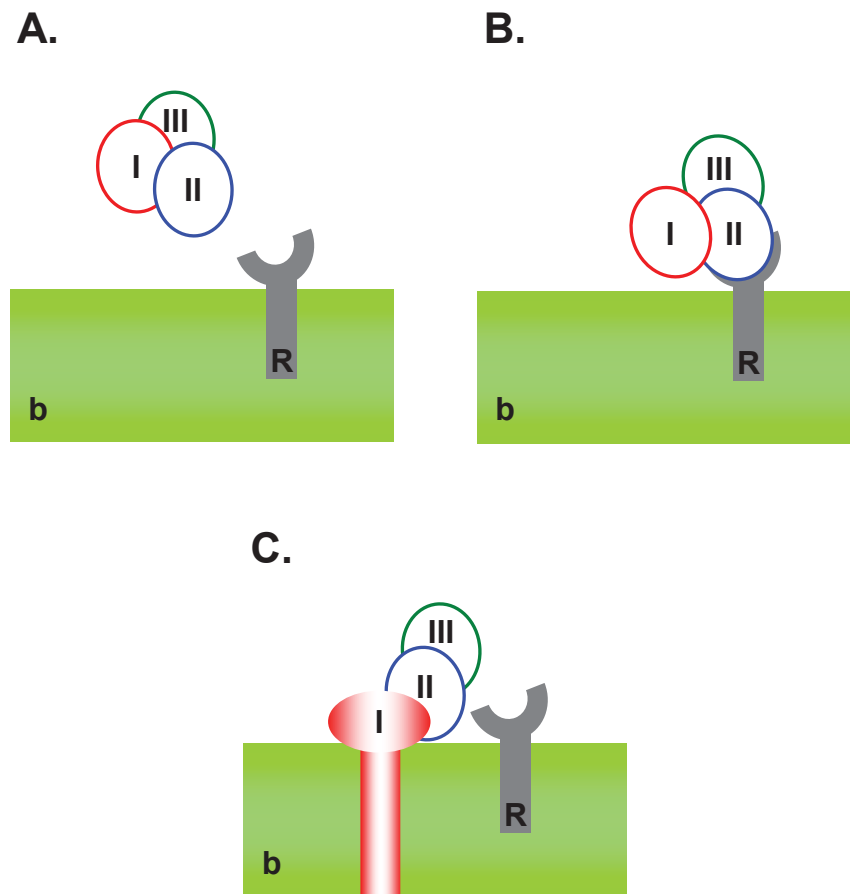


Figure 1.4. Représentation schématique de modèle « en parapluie » de la formation de pore par les toxines Cry insecticides. **A.** La toxine activée constituée de trois domaines n'est pas liée au récepteur (R) qui se trouve dans la bicouche (b). **B.** Liaison de la toxine activée au récepteur. **C.** L'épingle à cheveux $\alpha 4$ - $\alpha 5$ du domaine I d'un monomère s'insère dans la bicouche et l'oligomérisation des quatre épingles $\alpha 4$ - $\alpha 5$ des monomères forme le pore. Adapté de Vachon *et al.* (2012).

La formation de pores par les toxines Cry a été démontrée en utilisant une variété de systèmes d'études tels que les bicouches lipidiques planes, avec ou sans récepteurs (Sacchi *et al.*, 1986b; Haider et Ellar, 1989; Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Von Tersch *et al.*,

1994; Martin et Wolsfersberger, 1995; Carrol *et al.*, 1997; Racapé *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997b; Schwartz *et al.*, 1997c; Smedley *et al.*, 1997; Chandra *et al.*, 1999; Peyronnet *et al.*, 2000a; Peyronnet *et al.*, 2000b; Peyronnet *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2001; Vié *et al.*, 2001; Puntheeranurak *et al.*, 2004), les expériences en patch-clamp (Schwartz *et al.*, 1991), les essais de gonflement osmotique les lignées cellulaires intestinales des insectes cibles (Schwartz *et al.*, 1991; Villalon *et al.*, 1998a; Tran *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2005), sur les VMBB (Carrol et Ellar, 1997; Escriche *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2001; Kirouac *et al.*, 2002; Kirouac *et al.*, 2006), par utilisation des sondes fluorescentes (Monette *et al.*, 1997; Potvin *et al.*, 1998a; Kirouac *et al.*, 2003), par microscopie à force atomique (Vié *et al.*, 2001), par mesure des variations du potentiel membranaire de l'intestin isolé des insectes cibles (Peyronnet *et al.*, 1997; Fortier *et al.*, 2005) ainsi que par plusieurs autres études (Ahmad et Ellar, 1990; Slatin *et al.*, 1990; Gazit et Shai, 1993; Walters *et al.*, 1993; Von Tersch *et al.*, 1994; Schwartz *et al.*, 1997b; Schwartz *et al.*, 1997c; Masson *et al.*, 1999; Gerber et Shai, 2000; Girard *et al.*, 2009a; Girard *et al.*, 2009b).

Il est maintenant bien établi que chez les espèces de lépidoptères et de coléoptères le mode d'action des toxines Cry semble être similaire (Morin *et al.*, 2003; Jurat-Fuentes et Adang, 2006; Fabrick *et al.*, 2009). Les δ -endotoxines de *Bt* qui forment des pores dans les membranes font partie de la famille de toxines appelées PFTs (de l'anglais « *Pore-Forming Toxins* »).

1.2.5 Caractéristiques des pores induits par les toxines Cry

1.2.5.1 Architecture des pores

Le modèle en parapluie de l'architecture de pores proposé par Knowles et Ellar (1987) s'est avéré être en accord avec les observations rapportées par plusieurs études (Ahmad et Ellar, 1990; Wu et Aronson, 1992; Angsuthanasombat *et al.*, 1993; Gazit et Shai, 1993; Gazit *et al.*, 1994; Von Tersch *et al.*, 1994; Aronson *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995; Gazit *et al.*, 1998; Chandra *et al.*, 1999; Kumar et Aronson, 1999; Masson *et al.*, 1999; Gerber et Shai, 2000; Schwartz *et al.*, 2001; Tigue *et al.*, 2001; Kanintrokul *et al.*, 2003; Puntheeranurak *et al.*, 2004; Likitvivatanavong *et al.*, 2006; Tiewisiri et Angsuthanasombat, 2007; Girard *et al.*, 2008; Girard *et al.*, 2009a; Girard *et al.*, 2009b; Lebel *et al.*, 2009). Par exemple, Schwartz *et al.* (1997a) ont utilisé les techniques de la mutagenèse dirigée et de l'ingénierie des ponts disulfure au sein des régions putatives impliquées dans la formation de pores par la Cry1Aa activée par la trypsine. La toxine ainsi activée est dépourvue de cystéines, mais des mutants ont été conçus afin de créer des ponts disulfures intramoléculaires dans les domaines I et II. Les ponts disulfure (Arg224Cys et Ser279Cys) ont été conçus pour relier la partie N-terminale de l'hélice $\alpha 7$ de domaine I avec la région entre les hélices $\alpha 8a$ et $\alpha 8$ de domaine II. Aucune activité ionique n'a été observée lorsque ce mutant a été reconstitué dans les BLP. Cependant, l'addition de β -mercapthoéthanol, un agent réducteur des ponts disulfure, a conduit à l'apparition de l'activité ionique avec des caractéristiques électrophysiologiques semblables à celles de la Cry1Aa native, indiquant que le déploiement de la protéine au niveau de région reliant les domaines I et II est donc une étape nécessaire à la formation des pores. En outre, les mutants conçus pour limiter la flexibilité entre les hélices de domaine I (Arg99Cys et

Ala144Cys reliant les centres de $\alpha 3$ et $\alpha 4$, Ile88Cys et Tyr153Cys reliant la boucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$ avec celle de $\alpha 4$ - $\alpha 5$, Val162Cys et Ala207Cys reliant les centres de $\alpha 5$ et $\alpha 6$, Ser176Cys et Ser252Cys reliant les extrémités C-terminales des $\alpha 5$ et $\alpha 7$) ne présentent aucune activité du canal. Cette dernière n'est observée qu'après l'ajout de β -mercapthoéthanol, mettant ainsi en évidence le rôle central des hélices 4 et 5 dans l'insertion dans la membrane. Le modèle de pore proposé est celui d'un cylindre aqueux de diamètre approximatif de 6 Å et qui traverse la membrane, permettant le passage des ions K^+ . Les hélices 4 forment les parois du pore avec leurs surfaces hydrophiles face au centre du pore, alors que les hélices 5 sont confinées dans la membrane lipidique, jouant ainsi un rôle important dans l'oligomérisation des monomères. Les autres hélices ainsi que les domaines II et III s'étalent sur la bicouche lipidique conformément au modèle en parapluie ouvert. La formation de pores tétramériques par les toxines Cry1 a été aussi mise en évidence par d'autres études réalisées en BLP (Vié *et al.*, 2001; Peyronnet *et al.*, 2002; Laflamme *et al.*, 2008) et en imagerie par microscopie à force atomique (Vié *et al.*, 2001; Peyronnet *et al.*, 2002; Laflamme *et al.*, 2008). Plus récemment, une étude en fluorescence des pores formés par la Cry1Aa dans les bicouches lipidiques a révélé la présence majoritaire de tétramères, mais aussi de dimères et de trimères (Groulx *et al.*, 2011). En outre, des structures trimériques ont aussi été rapportées dans d'autres études (Aronson *et al.*, 1999; Kumar et Aronson, 1999; Likitvivatanavong *et al.*, 2006; Ounjai *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2008).

1.2.5.2 Dimensions des pores

Les pores formés par l'oligomérisation de structures monomériques ont un diamètre qui dépend de la toxine. En fonction des dimensions de pores, les PFT sont généralement

groupées en deux catégories : celle des PFT formant de petites pores de diamètre entre 1 à 2 nm, et celle formant de grandes pores de diamètre supérieur à 30 nm (Parker et Feil, 2005). La taille des pores formés par les toxines Cry, évaluée par différentes techniques, est typiquement de 1 à 2 nm de diamètre (Martin et Wolsfersberger, 1995; Carroll et Ellar, 1997; Villanon *et al.*, 1998; Peyronnet *et al.*, 2002). Cette taille est similaire à celle des pores formés par d'autres toxines PFT (Kristan *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2008; Iocavache *et al.*, 2008).

1.2.5.3 Perméabilités des pores

La perméabilité des pores formés par les toxines Cry a été examinée par de nombreuses études et dans différents systèmes tels que les VMBB, les liposomes, les lignées cellulaires et les bicouches lipidiques planes. Il a été démontré que les pores sont perméables à une variété de substances, y compris les cations monovalents, notamment K^+ (Sacchi *et al.*, 1986a; Wolfersberger, 1989; Slatin *et al.*, 1990; English *et al.*, 1991; Carroll et Ellar, 1993a; Knowles et Dow, 1993; Lorence *et al.*, 1995a; Lorence *et al.*, 1995b; Carroll et Ellar, 1997; Lorence *et al.*, 1997; Racapé *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997c), les cations divalents tels que Ca^{2+} (Schwartz *et al.*, 1991; Monette *et al.*, 1997; Potvin *et al.*, 1998b; Kirouac *et al.*, 2002), les anions tels que Cl^- (Schwartz *et al.*, 1993; Kirouac *et al.*, 2002), les solutés neutres comme l'alanine (Hendrickx *et al.*, 1990), les acides aminés (Kirouac *et al.*, 2002), ainsi que les gros solutés non électrolytes comme les oligosaccharides (Schwartz *et al.*, 1991; Carroll et Ellar, 1993b; Carrol et Ellar, 1997; Villanon *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2001). En fonction du pH, les pores formés par une toxine Cry pourraient posséder une sélectivité cationique ou une sélectivité anionique (Schwartz *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1993; Peyronnet *et al.*, 2001). Cependant, au pH alcalin caractéristique de lépidoptères, la formation des pores cationiques a

nettement été démontrée dans des expériences en BLP sans récepteurs (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Racapé *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997b) ou avec récepteurs (Lorence *et al.*, 1995b; Racapé *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997b; Peyronnet *et al.*, 2001).

1.2.6 Toxicité au niveau cellulaire

Plusieurs études sur le mode d'action des δ -endotoxines de *Bt* ont pu clairement établir très tôt que la cible initiale de ces toxines est la membrane apicale des cellules en colonne de l'intestin moyen des insectes où se produit la formation des pores lytiques (Heimpel et Angus, 1959; Endo et Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Percy et Fast, 1983; Gupta *et al.*, 1985; Lane *et al.*, 1989; Knowles et Dow, 1993; Kirouac *et al.*, 2006). Le mécanisme exact de la lyse cellulaire qui suit la formation des pores n'a pu, cependant, être pleinement établi. D'après une hypothèse initiale proposée par Knowles et Ellar (1987), le mécanisme par lequel les δ -endotoxines mènent à la lyse cellulaire est celui de la lyse osmotique colloïdale induite par le déséquilibre ionique, électrique et osmotique des cellules affectées suite à la formation de pores. La présence des pores permet l'entrée des ions dans les cellules accompagnés par un afflux de l'eau par osmose. La mort de l'insecte intoxiqué se produit soit par la paralysie de l'intestin et la cessation de l'alimentation provoquées par l'augmentation du pH de l'hémolymphe, soit par la septicémie provoquée par la rupture de l'épithélium intestinal qui permet aux spores de *Bt* d'accéder à l'environnement plus favorable de l'hémolymphe, où elles peuvent ensuite germer (Knowles, 1994). Knowles et Dow (1993) ont suggéré que la cessation de fonctionnement du mécanisme de transport des ions K^+ dans les cellules

intestinales de lépidoptère est un élément clé qui conduit au gonflement et à la lyse cellulaire suite à la formation des pores.

Sur le plan histologique, il a été montré que les cellules en colonne sont initialement endommagées (Lane *et al.*, 1989). Chez les insectes très sensibles, la mortalité s'observe dans un intervalle de 1 à 7 heures (Lane *et al.*, 1989) et chez d'autres insectes entre 2 à 7 jours (Gill *et al.*, 1992).

1.2.7 Mécanismes de résistance aux toxines Cry

La résistance des insectes aux toxines Cry de *Bt* est un problème observé dans des expériences en laboratoire depuis 1985 (McGaughey, 1985). Des niveaux significatifs de résistance à *Bt* furent observés pour la première fois dans les champs chez les populations de lépidoptères *P. xylostella* (Tabashnik *et al.*, 1990; Ferré *et al.*, 1991; Tabashnik, 1994; Liu et Tabashnik, 1997; Ferré, 2002). De nombreuses souches d'insectes résistants aux *Bt* ont été établies au fil des années (Frutos *et al.*, 1999; Ferré, 2002; Tabashnik *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). La résistance peut être due à la modification des différents éléments de la cascade de l'intoxication, tels que l'altération de la liaison des toxines Cry aux récepteurs cibles résultant de la diminution du nombre de sites de liaison ou de la modification de l'affinité des sites de récepteurs, ou à la diminution du nombre de récepteurs (Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Jurat-Fuentes et Adang, 2004).

Chez la population résistante de *P. interpunctella*, par exemple, la résistance pour Cry1Ab est due à la diminution de l'affinité des sites récepteurs pour cette toxine (Van Rie *et al.*, 1990). Chez les larves de *P. xylostella*, la résistance est liée à un nombre plus faible de

récepteurs pour Cry1Ab par rapport à Cry1B et Cry1C (Ferré *et al.*, 1991). La résistance a été corrélée à la diminution du nombre de récepteurs membranaires pour Cry1A chez *H. viscerens* (Jurat-Fuentes et Adang, 2004) et pour Cry5Ba chez *C. elegans* (Barrows *et al.*, 2006). D'autres modifications pourraient inclure une diminution dans la solubilisation de la protoxine et du taux d'activation de la protoxine en raison de l'absence d'une protéase nécessaire à l'activation ou à l'augmentation du taux de dégradation de la toxine (MacIntosh *et al.*, 1990; Oppert *et al.*, 1994; Rahardja et Whalon, 1995; Keller *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2001; Loseva *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2003; Rajagopal *et al.*, 2009). Le mode d'action et les voies de pathogenèse des toxines *Bt* sont complexes et, par conséquent, les mécanismes de résistance des insectes à ces toxines sont eux aussi complexes et potentiellement dus à la combinaison de plusieurs facteurs.

1.3 Les nématodes du sol et les géohélmintiasés (GH)

Les nématodes sont des invertébrés métazoaires du phylum *Nemata*. Ces vers ronds mènent une vie libre ou parasitaire. On connaît actuellement plus de 300 espèces de vers infectant les humains, parmi lesquelles certaines, tels que les nématodes du sol (les géohélmintés ou les vers intestinaux *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ankylostoma duodenale* et *Necator americanus*) provoquent des infections gastro-intestinales très graves et parfois mortelles, constituant ainsi une menace pour la santé publique. Selon une estimation de l'OMS, environ deux milliards de personnes sont actuellement infectées par au moins une espèce d'hélmintés, 50 % au moins étant des enfants et plus de 200 000 décès annuels dus aux schistosomiases en Afrique seulement (OMS, 2012). Ces parasites se rencontrent plus

fréquemment dans les zones climatiques chaudes et humides. Les régions pauvres de l'Asie, l'Afrique et l'Amérique latine où prévalent de faibles conditions d'hygiène sont les régions le plus touchées (OMS, 2012). La voie générale de transmission de l'infection est fécale-orale. Les œufs fécondés sont excrétés dans les selles libérés dans l'environnement et sont par la suite ingérés. Au stade adulte, les vers peuvent grandir jusqu'à 30 cm (*A. lumbricoides*) et peuvent s'attacher aux parois intestinales de l'hôte, se nourrissant du sang des couches de la muqueuse et de la sous-muqueuse, en perforant ainsi ces dernières. Les symptômes d'infection incluent l'inflammation des parois intestinales, les douleurs abdominales, la diarrhée, la fièvre, une perte d'appétit, les problèmes respiratoires, les saignements dans les excréments fécaux et urinaires, la pneumonie éosinophilique, la dysenterie, l'anémie et les troubles neurologiques (Hotez P. J. *et al.*, 2006). Les conséquences peuvent être fatales, en particulier chez l'enfant et la femme enceinte (Elliot *et al.*, 2005; Larocque *et al.*, 2005). Un grand nombre d'ankylostomes tels que *A. ceylanicum* infectent à la fois les animaux et l'humain. Les géohelminthes parasites (pour la plupart des vers du genre *Meloidogyne* ou nématodes à galles) sont aussi responsables de pertes économiques importantes pour l'industrie agricole, totalisant jusqu'à \$100 milliards mondialement (Cetintas et Yarba, 2010).

Certains médicaments antihelminthiques à large spectre comme l'albendazole, le mebendazole et le pyrantel sont présentement disponibles (OMS, 2012). Pour les nématodes du sol phytoparasitaires, la désinfection et l'utilisation des nématicides chimiques fumigènes constituent depuis plus de 50 ans la stratégie la plus efficace. Cependant, ces nématicides toxiques présentent des risques importants pour la santé humaine et l'environnement (Lifshitz et Gavrilov, 2000; Starr *et al.*, 2002). Le développement d'approches de lutte biologique plus

ciblées, efficaces et abordables est donc devenu indispensable et de grands efforts sont actuellement déployés afin d'identifier de telles approches.

À partir des années 2000 (Marroquin *et al.*, 2000), les *Bt* actifs contre les nématodes ont commencé à susciter un réel intérêt pour plusieurs raisons. Premièrement, les ravages causés aux humains par les nématopathies viennent au deuxième rang mondial, juste après ceux causés par le paludisme ou la malaria (OMS, 2010, 2011), et ce nombre ne diminue pas malgré l'utilisation de méthodes et de pratiques médicales modernes. Deuxièmement, le développement de la résistance aux médicaments et aux pesticides antihelminthiques chimiques actuellement employés constitue un sujet préoccupant (Fuller *et al.*, 2008). Dans les systèmes d'élevage industriel du bétail, la résistance aux produits antihelminthiques dépasse 50 % (Schwenkenbecher et Kaplan, 2009). Bien que les effets toxiques des souches de *Bt* sur les nématodes ainsi que sur la viabilité de leurs œufs aient été soulignés depuis longtemps (Ciordia et Bizell, 1961; Bone *et al.*, 1985; Bottjer et Bone, 1987), cette situation constitue un fort argument pour la mise en œuvre d'approches alternatives, notamment celles faisant appel aux toxines nématocides de *Bt*. Ces dernières constituent un moyen plus efficace et moins nocif pour l'environnement et la santé publique (Schneider *et al.*, 2003). Plus récemment, on s'est intéressé à l'utilisation de la biotechnologie pour le développement de plantes transgéniques résistantes exprimant divers gènes (Atkinson *et al.*, 2003; Molinari, 2011), dont les gènes de toxines Cry nématocides de *Bt* (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008), ce qui offrirait de nombreux avantages.

1.4 Toxines *Bt* nématocides

Plusieurs souches de *Bt* actives contre les parasites des humains, des animaux et des produits agricoles et forestiers nématodes libres ou parasitaires. Ces souches comprennent notamment celles qui produisent des δ -endotoxines appartenant aux familles Cry5, Cry6, Cry12A, Cry13A, Cry14A et Cry21A (Ciordia et Bizell, 1961; Bone *et al.*, 1985b; Eduards *et al.*, 1989; Borgonie *et al.*, 1995; Borgonie *et al.*, 1996a, b; Crickmore *et al.*, 1998; Marroquin *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2003; Schulenburg et Muller, 2004; Knox *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Hoss *et al.*, 2008). Cependant, seules les membres des familles Cry5B, Cry6A, Cry14A et Cry21A possèdent une toxicité appréciable, particulièrement contre *Nippostrongylus brasiliensis*, un nématode gastro-intestinal des rongeurs et des animaux domestiques (Wei *et al.*, 2003), et contre *A. ceylanicum* qui infeste aussi les humains (Capello *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2012). Les toxines Cry5Aa, Cry5Ab, Cry5Ac, Cry5Ba et Cry13Aa sont très actives contre des nématodes parasites du bétail dont certains sont résistants aux médicaments antihelminthiques, (Kotze *et al.*, 2005). L'élucidation du mode d'action des toxines Cry nématocides est donc devenue indispensable afin d'identifier des approches alternatives aux produits chimiques anti-parasitaires.

1.4.1 Effets toxiques des *Bt* nématocides

Contrairement à l'activité insecticide des δ -endotoxines Cry, on sait peu de choses sur le mode d'action des souches nématocides de *Bt*. Il a cependant été démontré que ces toxines n'affectent que les cellules intestinales de nématodes (Borgonie *et al.*, 1995; Leyns *et al.*,

1995; Marroquin *et al.*, 2000). Cependant, contrairement à la spécificité larvaire des toxines Cry insecticides (Knowles et Dow, 1993), les toxines nématocides semblent être aussi actives sur la larve et sur l'adulte (Borgonie *et al.*, 1995). La mortalité est observée entre 2 et 7 jours après exposition à la toxine, selon la dose et l'espèce considérées (Borgonie *et al.*, 1995; Borgonie *et al.*, 1996b, a; Marroquin *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2003).

1.5 Les protéines Cry5 de *Bt*

La souche PS86Q3 de *Bt* produit un cristal bipyramidal composé de cinq protéines majeures dont quatre appartiennent à la classe Cry5A, la dernière étant Cry5Ba. Il a été démontré que les protéines Cry5A sont spécifiquement actives contre plusieurs espèces d'insectes hyménoptères (de Maagd *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2001; Porcar *et al.*, 2008), alors que Cry5Ba est active contre plusieurs espèces de nématodes (Marroquin *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2003; Cappello *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2010a). La protéine Cry5Ba fait partie d'un sous-groupe phylogénique constitué de huit toxines de *Bt* de même origine : Cry5Aa, Cry5Ab, Cry5Ac, Cry5Ba, Cry12A, Cry13A, Cry14, et Cry21A (de Maagd *et al.*, 2001). Toutes ces protéines possèdent quatre des cinq blocs d'acides aminés conservés chez les toxines Cry, soit les blocs 1, 2, 4 et 5 (Schnepf *et al.*, 1998). Au lieu du bloc 3, les protéines Cry5 possèdent un autre bloc (c, **Figure 4.1**) conservé parmi ces protéines (Schnepf *et al.*, 1998). Le Cry5Ba est aussi phylogénétiquement relié aux toxines insecticides d'importance commerciale Cry1Aa, Cry3Aa et Cry4Aa (Cappello *et al.*, 2006; Crickmore *et al.*, 2012), bien qu'aucun effet nématocide n'ait été observé chez ces dernières (Saxena et Stotzky, 2001; Cappello *et al.*, 2006).

1.6 La protéine nématocide Cry5Ba

La protéine Cry5Ba (Code UniProtKB/Swiss-Prot : Q45712) est une protoxine de 140 kDa possédant une séquence de 1245 acides aminés (Crickmore *et al.*, 2012). La toxine a été découverte par Feitelson (1995). Des études ont démontré que la région de 79 kDa constituée des premiers 698 acides aminés pour la protoxine Cry5Ba est suffisante pour la toxicité contre *C. elegans* et *M. incognita* (Li *et al.*, 2008). Une autre forme active obtenue par trypsinisation correspond à un fragment de 59 kDa (Griffits *et al.*, 2001). En outre, la Cry5Ba est active contre *C. elegans* soit sous forme de cristaux protéiques soit sous forme de protéine exprimée dans la bactérie *E. coli* dont le ver se nourrit (Marroquin *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2003). La structure 3D de la Cry5Ba à la résolution de 2.3 Å vient tout juste d'être publiée (Hui *et al.*, 2012). Elle correspond bien à celle obtenue dans cette étude par modélisation par homologie avec celle de Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995) et décrite dans le CHAPITRE 4.

1.6.1 Récepteurs de Cry5Ba

Cry5Ba se lie à différents types de sphingoglycolipides présents chez *C. elegans*. Cinq gènes associés à la résistance et nommés *bre-1* à *bre-5* (*bre* pour « *Bt* resistant ») ont été isolés par une approche de mutagenèse (Marroquin *et al.*, 2000; Griffits *et al.*, 2001; Griffits *et al.*, 2003; Barrows *et al.*, 2007a; Barrows *et al.*, 2007b). Ces gènes codent pour des protéines glycosyltransférases, membres de la famille β -1,-3-galactosyltransférases, qui catalysent la biosynthèse des oligosaccharides glycolipidiques spécifiques dans la membrane

plasmique (Griffits *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002; Griffits *et al.*, 2003; Huffman *et al.*, 2004b; Griffits *et al.*, 2005; Ideo *et al.*, 2009). Chez *C. elegans*, une mutation dans chacun des gènes *bre* mène à la réduction de la toxicité de Cry5Ba (Marroquin *et al.*, 2000; Griffits *et al.*, 2001; Griffits et Aroian, 2005). La répression génique d'un autre gène *bre-1* produit un nématode mutant moins résistant à Cry5Ba (Barrows *et al.*, 2007). Ces récepteurs glycolipidiques sont spécifiques aux invertébrés et structurellement différents de ceux du mammifère (Griffits *et al.*, 2005), ce qui expliquerait que les toxines nématocides, y compris la Cry5Ba, soient sans effets nocifs sur les mammifères, en particulier l'humain.

1.6.2 Effets nématocides de Cry5Ba

La toxine Cry5Ba est efficace contre le nématode *C. elegans* ainsi que contre un nombre de nématodes parasites, y compris ceux qui parasitent l'homme, et plus particulièrement contre le parasite gastro-intestinal hématophage *A. ceylanicum* (Wei *et al.*, 2003; Cappello *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). Elle est aussi la plus prometteuse, en tant qu'outil thérapeutique (Huffman *et al.*, 2004b; Kao *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012). Il a été démontré que la létalité induite par la Cry5Ba est dose-dépendante. Chez *C. elegans*, à une dose létale médiane (DL₅₀) de 12 µg/mL (ou 90 nM) de Cry5Ba exprimée dans *E. coli* JM103, l'ingestion de la toxine s'observe 1 à 3 heures après l'exposition, tandis que la mortalité l'est après 4 à 5 jours (Marroquin *et al.*, 2000; Griffits *et al.*, 2001; Griffits *et al.*, 2003). À une DL₅₀ d'environ 8 µg/mL, la toxine tue *C. elegans* en 6 jours (Hu *et al.*, 2010b). Chez les *C. elegans* qui ont été cultivés dans des puits contenant Cry5Ba purifiée à une concentration de 10 µg/mL, la mort des vers survenait entre 24 et 48 heures après l'introduction de la toxine.

D'autre part, il a aussi été démontré que Cry5Ba est un facteur essentiel de virulence requis pour l'infection létale de *C. elegans* par des bactéries de *Bt* (Kho *et al.*, 2011). L'intoxication affecte au niveau morphologique l'intestin, ainsi que la production d'œufs et la croissance (Marroquin *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2003; Cappello *et al.*, 2006).

1.6.3 Potentiel thérapeutique et de lutte biologique de Cry5Ba

Parmi les toxines nématocides, la Cry5Ba est un des meilleurs choix pour développer des agents vermifuges pour des applications en médecine humaine et vétérinaire, puisqu'elle démontre des effets antihelminthiques *in vivo* comparables aux produits antihelminthiques actuellement utilisés (Capello *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010a; Hu *et al.*, 2010b). De plus, lorsqu'elle est exprimée dans les racines des plantes, la Cry5Ba présente un excellent potentiel dans la lutte biologique contre les vers phytoparasitaires (Li *et al.*, 2008). Le potentiel nématocide de Cry5Ba a donc constitué la base rationnelle pour entreprendre les travaux de recherche présentés dans ce mémoire et visant à l'élucidation du mode d'action moléculaire de cette toxine.

CHAPITRE 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Il n'existe que très peu d'information sur le mode d'action exact des toxines Cry nématocides, à part le fait qu'elles se lient à des récepteurs glycolipidiques dans les cellules intestinales des nématodes et endommagent ces cellules. Dans le but de contribuer à l'avancement des connaissances sur leur mode d'action et à favoriser l'utilisation optimisée de la toxine nématocide Cry5Ba comme outil de thérapie antihelminthique, ce travail de recherche se fonde sur une hypothèse générale :

Hypothèse. La toxine Cry5Ba est une toxine formeuse de pores (PFT).

L'objectif principal suivant a donc été fixé dans cette recherche :

Objectif. Tester l'hypothèse et caractériser les réponses observées à l'origine de la perméabilisation (en cas de formation de pores : conductance, sélectivité ionique, dépendance au pH, cinétique), au moyen d'expériences en bicouches lipidiques planes.

En raison de l'importance de la toxine Cry5B pour le contrôle des nématodes dans le domaine de la santé, on avait initialement fait une seconde hypothèse, à savoir que le site d'action de la toxine était l'intestin de nématode. Malheureusement, on n'a pas réussi à le démontrer par des expériences préliminaires (au moyen d'une sonde fluorescente, l'homodimère-1 de l'éthidium) afin de mesurer la viabilité de *C. elegans* exposé à Cry5B.

CHAPITRE 3. MÉTHODES ET MATÉRIELS

Plusieurs techniques électrophysiologiques ont été utilisées depuis longtemps dans le but d'acquérir une meilleure compréhension des propriétés biophysiques des canaux ioniques. Parmi ces techniques celles des BLP artificielles (Muller *et al.*, 1962a; Muller *et al.*, 1962b) constitue un modèle simple qui offre des avantages parfois inaccessibles dans d'autres techniques. D'abord, le contenu lipidique de la bicouche, sa composition, le pH et la concentration ionique des solutions aqueuses de part et d'autre de la membrane peuvent être précisément définis et facilement variés par l'expérimentateur de sorte que ses propriétés physico-chimiques fondamentales soient très semblables à celles des membranes biologiques. Ensuite, la technique de BLP permet l'étude des propriétés des canaux ioniques lorsque ces derniers ne peuvent pas être étudiés dans leur environnement physiologique tel celui d'une cellule intacte comme c'est le cas pour la technique de patch-clamp. On outre, dans la technique des BLP les protéines qui ne sont pas intrinsèques à la cellule (comme les toxines), peuvent être purifiées et reconstituées dans la bicouche, permettant ainsi l'étude de leurs caractéristiques propres, sans l'influence des autres constituants de la membrane cellulaire native (Koulen, 2003). La technique des BLP a donc été utilisée dans cette étude afin d'étudier les propriétés électrophysiologiques de la toxine Cry5Ba. Elle est décrite dans la section suivante.

3.1 Bicouches lipidiques planes

Les phospholipides sont une famille de lipides les plus abondants dans la composition de toutes les membranes biologiques. Ils sont formés d'un côté par un groupement carboxylique chargé électriquement, polaire et hydrophile (appelé « tête polaire »), et de l'autre côté, par deux chaînes hydrophobes d'acides gras non chargés et apolaires (appelée « queue hydrophobe »). La tête hydrophile des phospholipides contient typiquement des groupements phosphates négativement chargés ou des groupes non chargés polaires. La formation de la BLP suit le principe suivant : lorsque les molécules amphiphiles des phospholipides utilisés se mettent en contact avec un milieu aqueux, elles s'auto-organisent spontanément pour former un agrégat en double couche. Ceci se produit grâce à des interactions électrostatiques ou la formation des ponts hydrogène entre les têtes hydrophiles des phospholipides et les molécules du milieu aqueux. Les queues hydrophobes, repoussées par l'eau, s'alignent les unes en face les autres et s'enfouissent au centre de la bicouche. Les têtes hydrophiles s'exposent à l'interface aqueuse de part et d'autre de la bicouche (Alberts *et al.*, 2002). Cette organisation énergétiquement stable permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes des phospholipides et les molécules d'eau.

3.2 Montage expérimental

L'ensemble du dispositif expérimental utilisé dans cette étude est montré dans la **Figure 3.1**. Il se compose d'un support (**1, Figure 3.1**) constitué de polychlorure de vinyle (PVC), dans lequel deux compartiments cylindriques adjacents, appelés *cis* et *trans*, ont été

usinés. Une coupe cylindrique (**2, Figure 3.1**) fabriquée en polyacétal est insérée dans le compartiment *cis*. La coupe contient, dans sa paroi latérale, une petite région circulaire amincie dans laquelle un orifice (**3, Figure 3.1**) de 250 μm de diamètre et de 75 μm d'épaisseur a été percé. Les dimensions de l'orifice sont importantes dans l'obtention de bicouches appropriées. Les nombreuses études effectuées au fil des années dans notre laboratoire ont établi qu'une telle dimension d'orifice est assez petite pour réduire le bruit de fond du courant grâce à une faible capacitance de la bicouche, mais est suffisamment grande pour permettre à la fois la visualisation de l'orifice et un taux acceptable d'incorporation de protéines. Avant son insertion dans le compartiment *cis*, la coupe de polyacétal est prétraitée avec un mélange de lipides (section 3.2.3), dispersés dans le solvant non polaire *n*-décane, dans le but de faciliter la formation de la bicouche. La coupe prétraitée est ensuite immédiatement insérée dans son logement du montage expérimental. Les solutions aqueuses de KCl (section 3.2.3) sont ajoutées dans chaque compartiment : 0.8 mL du côté *cis* et 1.6 mL du côté *trans*, respectivement. Le potentiel électrique de commande (V_c) est appliqué au compartiment *cis*, le compartiment *trans* étant maintenu à la terre virtuelle. La continuité électrique entre l'amplificateur de contrôle et de mesure et les solutions électrolytes dans chacun des compartiments est réalisée par l'intermédiaire des ponts d'agar-agar (**4, Figure 3.1** et section 3.2.5) placés entre les compartiments et des petits puits (**6, Figure 3.1**) remplis de solution 3M de KCl, dans lesquels baignent les électrodes d'Ag/AgCl₂ (**5, Figure 3.1**) connectés à l'amplificateur (**11, Figure 3.1**). Les ponts d'agar-agar assurent la minimisation des potentiels de jonctions et évitent la contamination des solutions KCl avec les ions Ag⁺ et celle des électrodes avec les protéines à l'étude.

3.2.1 Formation de la bicouche

La partie avant du compartiment *trans* possède une fenêtre de verre (8, **Figure 3.1**), à travers laquelle on peut observer, à l'aide d'une loupe binoculaire et d'un illuminateur à fibre optique, l'orifice de la coupe (3, **Figure 3.1**) sur lequel la bicouche sera peinte. La bicouche est peinte au moyen d'une pipette Pasteur, à l'extrémité de laquelle une boule de taille très petite a été formée à la flamme d'un bec Bunsen. Sous observation binoculaire, une gouttelette de solution lipidique récupérée avec la pipette Pasteur est déposée sur l'orifice d'un mouvement vertical. Une bicouche de quelques micromètres d'épaisseur se forme initialement à travers l'orifice. Elle s'amincit ensuite spontanément sous l'effet de plusieurs forces thermodynamiques. Ces forces permettent aussi l'évacuation des molécules de solvant piégées dans la bicouche pendant sa formation (White, 1986). En vertu de la thermodynamique, la bicouche s'amincit à une épaisseur d'équilibre proche de la valeur d'environ 10 nm des membranes naturelles ou d'une capacitance de surface d'environ 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Dowling, 2001). Dans cette étude, la qualité de la BLP formée a été évaluée par la mesure de sa capacitance électrique (section 3.2.6). Pour ce faire, un potentiel test triangulaire (40 mV crête-à-crête, 10 Hz) est appliqué à la bicouche, à l'aide d'un bouton CAP TEST du système de l'amplificateur. L'amplitude de l'onde carrée du courant qui en résulte est proportionnelle à la capacitance, C_m , de la bicouche. Elle est affichée sur l'oscilloscope (12, **Figure 3.1**). Dans cette étude, les capacitances typiques de membranes variaient entre 160 et 240 pF. Pour un diamètre efficace de la bicouche d'environ 125 μm et une capacitance moyenne de 200 pF, on obtient une capacitance spécifique d'environ 1.6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, une valeur très proche de la valeur de 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ caractéristique de la plupart des membranes biologiques.

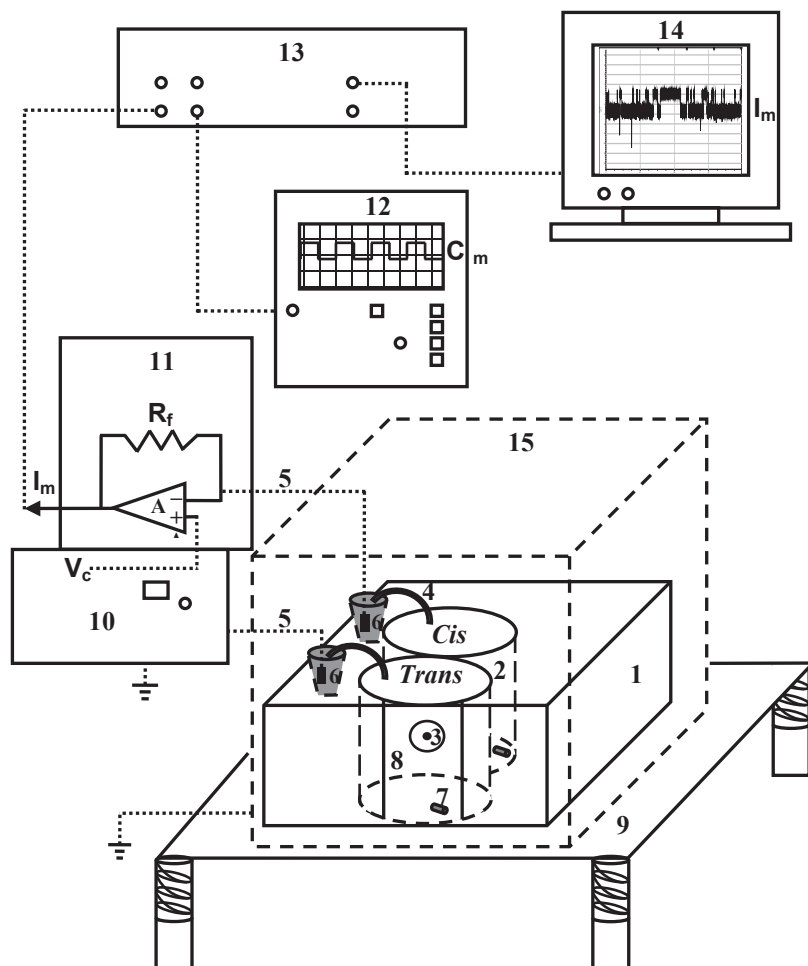


Figure 3.1. Diagramme simplifié du montage expérimental pour les mesures en BLP. 1. Support. 2. Coupe avec 3 : Orifice de diamètre 250 μm sur lequel est peinte la membrane. 4. Ponts d'agar-agar. 5. Électrodes Ag/AgCl₂. 6. Puits contenant 3M de KCl. 7. Barreaux d'agitation magnétiques. 8. Fenêtre de verre. 9. Table anti-vibrations. 10. Système de commande de potentiel. 11. Amplificateur du courant. 12. Oscilloscope. 13. Convertisseur analogique-numérique. 14. Ordinateur. 15. Cage de Faraday. V_c : Potentiel de commande. I_m : Courant transmembranaire. R_f : résistance (10 G Ω) de contre-réaction du système de l'amplification du courant I_m . Par souci de clarté, le dispositif de la bicouche est présenté à une échelle agrandie par rapport aux autres éléments du montage.

Afin de vérifier la stabilité de la bicouche et l'absence de contamination, des potentiels de ± 60 mV sont appliqués pour une période de 20 à 30 minutes. Aucune activité canal ne doit être observée et le courant à travers la bicouche doit rester plus petit que 1 pA dans notre cas.

3.2.2 Reconstitution de la toxine

La toxine Cry5Ba, sous la forme purifiée et activée de 59 kDa (Kao *et al.*, 2011), est injectée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans le compartiment *cis* du montage. Dans le but d'obtenir des courants unitaires, des petites doses de 5 à 10 $\mu\text{g/mL}$ ont été utilisées. Afin de promouvoir et faciliter l'insertion de la toxine dans la bicouche, la solution dans le compartiment *cis* est agitée continuellement par l'intermédiaire d'un barreau magnétique (7, **Figure 3.1**), mis en mouvement à l'aide d'un agitateur magnétique situé en-dessous du montage. L'insertion est aussi favorisée par le maintien de potentiels entre ± 60 mV. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante de 20 à 22°C. Une série de potentiels électriques est appliquée. Si la toxine forme des pores, l'acquisition des sauts de courant ioniques correspondants à travers la bicouche est accomplie au moyen d'un amplificateur de courant (11, **Figure 3.1**) qui utilise un circuit de rétroaction résistif, avec $R_f = 10 \text{ G}\Omega$, pour amplifier les courants I_m mesurés. Les signaux analogiques sont ensuite convertis au moyen du convertisseur analogique-numérique (13, **Figure 3.1**) et sont transmis pour affichage au l'oscilloscope et à l'ordinateur (12 et 14, **Figure 3.1**, respectivement) où ils sont visualisés, enregistrés et analysés.

3.2.3 Lipides et solutions expérimentales

Les lipides L- α -phosphatidyléthanolamine (PE) et L- α -phosphatidylcholine (PC) ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) dans une solution-mère de chloroforme afin d'éviter l'oxydation, et sont conservés à -20°C avant leur utilisation. Le cholestérol (Chol) a été obtenu en poudre de Sigma. La solution lipidique utilisée pour former les bicouches est constituée d'un mélange de PE, PC et Chol dans le rapport 7:2:1 (en masse). Le mélange lipidique est initialement séché par évaporation du chloroforme sous un jet d'azote pendant 25 minutes. Le mélange ainsi séché a été par la suite re-suspendu dans du *n*-décane à 99 % (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin) afin d'obtenir une concentration finale de lipides de 10 mg/mL. Ensuite, il est délicatement passé au vortex. Le mélange lipidique est fraîchement préparé avant chaque session expérimentale.

Les solutions salines tamponnées suivantes (en mM) ont été utilisées : 150 ou 450 KCl, 1 CaCl₂, 10 Tris pH 9.0 (ajusté avec 1N KOH), ou 150 ou 450 KCl, 1 CaCl₂, 5 MES pH 6.0 (ajusté avec 1N HCl). Les solutions sont préparées à l'eau MilliQ. Elles sont filtrées deux fois à travers des filtres Millipore de 0.22 μ m avant leur utilisation. KCl, EDTA, TRIS base et MES sont de pureté analytique et ont été acquis auprès de Sigma (St. Louis, Missouri, USA).

3.2.4 Préparation des coupes de Téflon

Un nettoyage approfondi des coupes est extrêmement important afin d'éviter tout risque de contamination par des protéines non désirées. Les coupes sont immergées dans une solution de NaOH à 1M pendant 24 h. Ensuite, elles sont rincées abondamment à l'eau

distillée, puis à l'éthanol à 75 %, puis au chloroforme, afin d'éliminer toutes traces de sels, de toxine, de lipides ou d'autres impuretés. Les coupes sont par la suite séchées pendant 15 minutes à la chaleur d'une lampe. Afin de faciliter la formation de la bicouche, à l'aide d'une loupe binoculaire, une gouttelette de la solution phospholipidique est déposée sur le côté externe de l'orifice de la coupe. La coupe est soumise à un jet d'azote afin de faire s'évaporer le solvant *n*-décane en conditions non oxydantes. La coupe ainsi prétraitée est immédiatement insérée dans le montage expérimental.

3.2.5 Fabrication des ponts d'agar-agar

Des ponts en forme de U sont construits en utilisant des capillaires en verre de diamètre intérieur de 0.5 mm. Cette dimension empêche le transfert du matériel à travers le pont et n'augmente pratiquement pas la résistance en série du système. Les capillaires sont coupés en petits tubes de longueur d'environ 3 cm, en utilisant un coupe-verre. Les tubes sont chauffés délicatement à la flamme d'un bec Bunsen et pliés, à l'aide d'une pince, à la forme désirée. Une solution de gélose constituée de 2 % d'agar-agar, de 1 mM d'EDTA dans 1M de KCl a été utilisée pour remplir les ponts. Les ponts ont été remplis à ras bord de gélose chaude au moyen d'une seringue. Une attention particulière est accordée afin de ne pas piéger des bulles d'air dans les ponts. Les ponts ainsi remplis sont immédiatement placés dans une solution de 1M de KCl et 1mM d'EDTA afin d'éviter le rétrécissement de la gélose au cours du refroidissement, ainsi que le dessèchement des extrémités. Avant utilisation, les ponts sont inspectés pour détecter toute présence de bulles d'air.

3.2.6 Modèle électrique de la membrane lipidique

Les solutions d'électrolytes qui se trouvent de part et d'autre de la membrane lipidique sont des milieux liquides conducteurs, constitués principalement de différents sels dissous dans l'eau. Une membrane lipidique pure et sans canaux ioniques, en raison de sa nature amphiphile, ne permet pas le passage des ions d'un milieu à l'autre. Elle se comporte alors comme un bon isolant électrique qui sépare ces deux milieux. La membrane agit donc comme un condensateur à plaques parallèles dont les propriétés électriques sont déterminées par sa capacitance, C_m (**Figure 3.2**). Lorsque la membrane est rendue perméable aux ions par une protéine, la facilité avec laquelle un type d'ions traversent le canal est exprimée en termes de la perméabilité P_{ion} ou de la conductance G_m (en Siemens) $= 1/R_m$ avec R_m (en Ohms), étant la résistance du canal ouvert. Sur le plan électrique, la BLP perméable aux ions peut être décrite au moyen de son circuit électrique équivalent constitué de la capacitance C_m de la bicouche imperméable en parallèle avec la conductance G_m du canal ionique dans la bicouche (**Figure 3.2**). Lorsqu'il n'y a pas de gradient de concentration ionique, en mesurant le courant I_m circulant dans le canal ionique lorsqu'un potentiel membranaire V_m est appliqué à la membrane, on peut en déduire la conductance G_m pour les conditions ioniques choisies. Pour un canal qui se comporte de manière ohmique, c'est-à-dire linéaire, le $V_m = I_m \times R_m$ ou $I_m = G_m \times V_m$. La conductance unitaire d'un canal ionique est une caractéristique spécifique du canal fortement reliée à sa structure.

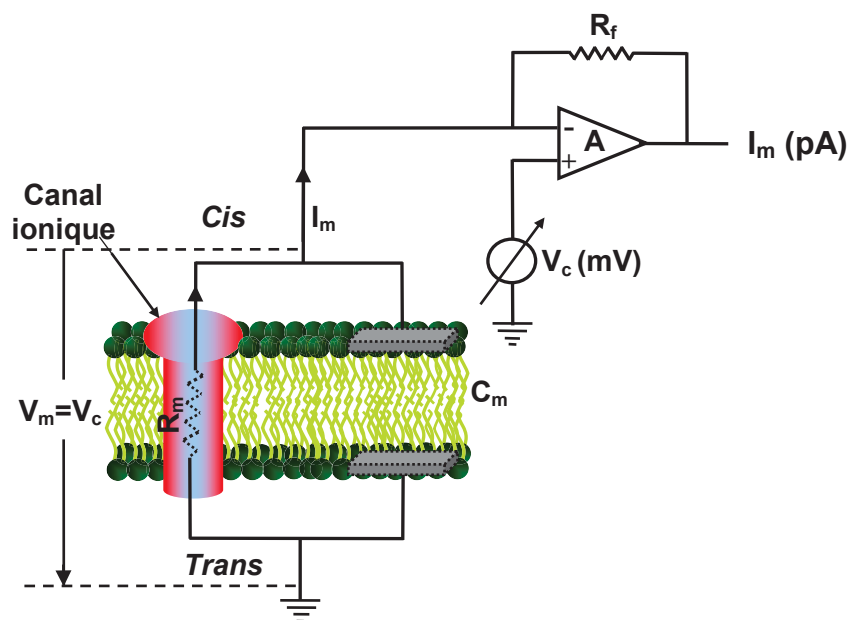


Figure 3.2. Schéma simplifié du circuit équivalent de la membrane lipidique perméable aux ions. C_m : capacitance de la bicouche. G_m : conductance du canal ionique formé par la protéine insérée dans la bicouche. V_c : source de potentiel imposé à la bicouche. A : amplificateur opérationnel du courant. R_f : résistance de rétroaction du système de l'amplificateur. I_m : courant mesuré.

3.2.7 Acquisition et convention de signe du courant

Les courants ioniques à travers la protéine Cry5Ba reconstituée en BLP ont été mesurés à l'aide d'un système Bilayer Clamp Model BC-525C (Warner Instruments, Hamden, Connecticut, USA). Cet amplificateur a été utilisé en configuration de potentiel imposé ou « *Voltage-Clamp* » (Meves, 1984). Dans cette configuration, le potentiel appliqué V_c (**Figure 3.1**) est maintenu à des niveaux constants choisis par l'expérimentateur. Le courant transmembranaire I_m en réponse à ces potentiels imposés est mesuré sous la forme de potentiel électrique par l'amplificateur fonctionnant en convertisseur analogique courant-

potentiel (**11, Figure 3.1**). Ces potentiels, représentant les courants mesurés I_m , sont filtrés à 1 kHz (-3dB) au moyen d'un filtre intégré analogique passe bas du type Bessel à huit pôles (Frequency Devices, Haverhill, Massachusetts, USA), puis échantillonnés à 2.5 kHz en utilisant l'interface Digidata1440A (Axon CNS, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). Les potentiels (V_c) imposés à la membrane sont échantillonnés par l'interface à la même fréquence. Les courants et les potentiels à la sortie de convertisseur sont visualisés et enregistrés dans un ordinateur PC, en utilisant la version 10.2 du logiciel Axoscope (Axon Instruments, Foster City, California, USA).

La convention choisie pour le signe du courant est la suivante : une déflexion positive du courant observée sur l'oscilloscope ou enregistrée dans le logiciel d'acquisition, en réponse à un potentiel de membrane imposé positif, correspond à un mouvement de charges positives dans le sens *cis-trans*. Le potentiel de commande étant appliqué au compartiment *cis* alors que le compartiment *trans* est maintenu à la terre virtuelle, le potentiel transmembranaire, V_m , est donc égal au potentiel électrique de commande V_c appliqué dans le compartiment *cis*, à condition que les potentiels de jonction aient été correctement corrigés.

3.2.8 Potentiels de jonction et interférences

Des potentiels de jonctions se produisent à l'interface de milieux conducteurs différents. On peut donc s'attendre à l'apparition de potentiels de jonction à l'interface entre les ponts d'agar-agar ou les électrodes $Ag/AgCl_2$ et les solutions électrolytes de KCl. En raison de la symétrie expérimentale du montage utilisé dans cette étude, les potentiels de jonction sont en sens opposé et s'annulent pratiquement. En outre, il a été établi que les

potentiels de jonction liquide restaient inférieurs à 2 mV en conditions asymétriques de 450/150 mM (*cis/trans*) de KCl (Peyronnet *et al.*, 2000b). Par conséquent, aucune correction du potentiel de jonction n'a été appliquée dans les expériences faites dans cette étude.

Le montage expérimental d'étude des canaux incorporés en bicouches lipidiques a été placé dans une petite cage de Faraday couverte d'une mousse absorbante d'insonorisation, reliée à la terre, et placée sur une table anti-vibration afin de le protéger de tous les inconvénients provenant des sources de bruit électromagnétique, mécanique et acoustique.

3.3 Enregistrements et analyse de courants ioniques

Les courants enregistrés ont été analysés à l'aide du logiciel pClamp version 10.2 (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Ces courants sont d'abord filtrés à 150 Hz (-3dB) par le filtre numérique Gaussien du logiciel. Les amplitudes de courants sont mesurées manuellement à l'aide des curseurs horizontaux disponibles dans le logiciel ou automatiquement grâce à la fonction de génération des histogrammes représentant la distribution de tous les points de l'enregistrement (histogramme d'amplitude). L'histogramme d'amplitudes donne la distribution de toutes les amplitudes de courant observées pendant l'expérience (axe horizontal en pA, axe vertical nombre d'événements pour chaque valeur de courant). La méthode manuelle a été utilisée pour l'analyse des niveaux de conductance correspondant à des événements moins fréquents et de courte durée dont l'identification sur les histogrammes d'amplitudes était difficile ou impossible.

3.3.1 Détermination des conductances

L'enveloppe des distributions des amplitudes obtenues par analyse automatique a été ajustée par une ou la somme de fonctions gaussiennes (une pour chaque état) en utilisant la méthode de moindres carrés avec l'algorithme Levenberg-Marquardt disponible dans le logiciel pClamp. L'amplitude moyenne du courant de chacun des états est déterminée comme la valeur moyenne de chacun des pics gaussiens.

3.3.2 Détermination des relations courant-potentiel (I-V)

Les relations I-V ont été générées comme suit : pour chaque expérience et à chaque potentiel appliqué, les amplitudes de courant des sauts identifiables ont été mesurées. Les valeurs semblables des sauts identifiés (typiquement de 1 à 30) sur un tracé de courant ont été regroupées et leur moyenne a été calculée. Les valeurs moyennes obtenues ont été tracées en fonction du potentiel appliqué. Les valeurs ainsi obtenues dans d'autres expériences ont été par la suite regroupées et moyennées sur le nombre d'expériences dans lesquelles ces valeurs ont été observées.

3.3.3 Cinétique, probabilité d'ouverture, et sélectivité ionique

3.3.3.1 Temps d'ouverture et de fermeture

Les canaux ioniques peuvent passer à travers une série d'états discrets d'ouverture ou fermeture par des transitions indépendantes qui sont de nature aléatoire. La longueur de temps pendant laquelle un canal reste dans un état particulier (ouvert ou fermé) est aussi une variable

aléatoire. Cette variabilité peut être décrite par une fonction de densité de probabilité de type exponentielle décroissante de la forme générale : $f(t) = \tau^{-1} \cdot e^{-t/\tau}$ où t est un intervalle de temps de séjour du canal dans un état particulier (ouvert ou fermé) et τ est la constante de temps de l'exponentielle ou le temps moyen de séjour du canal à cet état (τ_o pour l'état ouvert ou τ_f pour l'état fermé). La fonction de densité de probabilité $f(t)$ est définie de telle sorte que l'intégrale de $f(t)$ de 0 à t est la probabilité que le canal reste dans un état ouvert pour un temps inférieur à t . Dans cette étude, les histogrammes de temps d'ouverture ou de fermeture ont été ajustés par des fonctions exponentielles du type $f(t)$ et la méthode du maximum de vraisemblance de l'algorithme Levenberg-Marquardt, disponible dans le logiciel pClamp, a été utilisée. Lorsqu'il y a plusieurs états d'ouverture (ou de fermeture), les histogrammes de temps d'ouverture ou de fermeture ont été ajustés par la somme pondérée de plusieurs exponentielles de la forme $f(t)$.

3.3.3.2 Probabilité d'ouverture

Lorsqu'un seul canal est présent dans la membrane, sa probabilité d'ouverture, p_o est estimée par le rapport de l'aire correspondant à l'histogramme d'amplitude du courant à l'état ouvert et l'aire totale de l'histogramme d'amplitude du courant (tel que décrit au début de la section 3.3). Cette valeur est obtenue de façon automatique dans le logiciel pClamp. Quand les enregistrements de courant contiennent un ensemble de N canaux unitaires, dont certains d'entre eux (ou tous) peuvent s'ouvrir simultanément, l'analyse devient plus complexe. L'activité des canaux, en ce cas-là, est décrite par la probabilité moyenne de l'ouverture de tous les N canaux, Np_o , (Colquhoun et Hawkes, 1995). Pour plusieurs types de canaux

catégorisés « potentiel-dépendants », la probabilité d'ouverture, p_o , varie en fonction du potentiel appliqué à la membrane.

3.3.3.3 Sélectivité ionique

Pour un canal ionique perméable à une seule espèce d'ions de concentrations différentes de part et d'autre de la membrane, le flux d'ions à travers le canal est entraîné par l'effet du gradient de potentiel électrochimique transmembranaire qui existe pour cet ion. Le gradient du potentiel chimique, E_{ion} , favorise le flux de l'ion dans le sens du gradient de concentration. Le gradient du potentiel électrique, V_m , favorise leur flux dans un sens qui peut appuyer le gradient de concentration ou s'y opposer. Le flux net de l'ion à travers du canal dépend de la différence de ces deux composantes du potentiel électrochimique. Quand V_m est contrebalancé par E_{ion} , le gradient électrochimique pour l'ion est nul et le flux net (ou le courant total) à travers le canal est aussi nul. L'ion est en état d'équilibre électrochimique. La valeur du E_{ion} pour laquelle cette état d'équilibre est atteint est appelée le « potentiel d'équilibre d'ion » et peut être calculée à l'aide de l'équation de Nernst suivante (Hille, 1992a):

$$E_{ion} = \frac{R \cdot T}{z_{ion} \cdot F} \ln \frac{[C_{ion}]_{trans}}{[C_{ion}]_{cis}} \quad (1)$$

avec : R (constante des gaz parfaits) = $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$; T (température absolue en degré Kelvin) = $273.16 + T(^{\circ}\text{C})$; F (constante de Faraday) = $9.649 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$; z_{ion} (valence de l'ion considéré); $[C_{ion}]_{trans}$ et $[C_{ion}]_{cis}$ sont les concentrations de l'ion considéré dans les compartiments *trans* et *cis* ou extérieur et intérieur dans le cas de la cellule. E_{ion} est aussi

appelé le potentiel d'inversion, E_{inv} , puisque c'est aussi la valeur du potentiel transmembranaire pour laquelle le courant ionique net, qu'il entraîne, change de sens (passe du positif ou négatif) quand V_m dépasse E_{ion} . En présence d'un gradient de concentration 450/150 mM KCl, la résolution de l'équation (1) pour les conditions expérimentales (solutés, concentration et température) utilisées dans cette étude, donne les valeurs $E_{K^+} = -27.8$ mV et $E_{Cl^-} = +27.8$ mV des potentiels d'équilibre lorsque le canal est uniquement perméable à l'un des deux ions. Cependant, la plupart des canaux ioniques ne sont pas parfaitement sélectifs et sont donc perméables à plusieurs types d'ion. Le potentiel d'équilibre est alors calculé en appliquant la forme généralisée de l'équation de Nernst, connu sous le nom « équation de potentiel » de Goldman-Hodgkin-Katz ou GHK (Hille, 1992b). Lorsque les ions perméants sont le potassium et le chlore l'équation GHK prend la forme suivante :

$$E_{inv} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_{trans} + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_{cis}}{P_{K^+} \cdot [K^+]_{cis} + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_{trans}} \quad (2)$$

où P_{K^+} , P_{Na^+} et P_{Cl^-} sont les constantes de perméabilité du canal aux ions K^+ , Na^+ et Cl^- . Les autres paramètres sont les mêmes que dans l'équation (1). Pratiquement, les valeurs E_{inv} correspondent aux valeurs de potentiel V_m obtenues aux points d'intersections des ces courbes I-V avec l'axe de l'abscisse V. La substitution des valeurs connues E_{inv} dans l'équation (2) permet la détermination quantitative du rapport P_{K^+}/P_{Cl^-} et donc de la sélectivité ionique relative du canal.

CHAPITRE 4. RÉSULTATS

4.1 Modélisation par homologie de la structure 3D de Cry5Ba

Le modèle théorique de la structure tridimensionnelle de Cry5Ba (Code UniProtKB : Q45712) a été prédit dans cette étude, par homologie avec la structure élucidée de la toxine Cry1Aa (Code UniProtKB: Q5QKM8). Le Cry1Aa est une protoxine de 133 kDa et d'une séquence de 1176 AA. Sa forme activée est de 65 kDa et comprend un total de 590 AA situés entre les résidus 33 à 609 (Grochulski *et al.*, 1995). Un alignement initial des séquences des deux toxines a été réalisé en utilisant le programme BLAST de Swiss-Model (Arnold *et al.*, 2006). L'alignement initial ainsi obtenu a été par la suite ajusté manuellement à l'aide du logiciel Swiss-PdbViewer 3.7, de sorte que les différences résultant des divers domaines II dans les toxines Cry et l'absence du bloc 3 de Cry5Ba soit minimisées. La Cry5Ba possède quatre des cinq blocs d'acides aminés conservés parmi les δ -endotoxines Cry. Afin d'obtenir un modèle compatible avec Cry1Aa, un alignement satisfaisant des séquences appartenant aux quatre blocs conservés a été visé. L'alignement ainsi obtenu est présenté à la **Figure 4.1**. Les blocs conservés, ainsi que le motif caractéristique aux toxines nématocides sont indiqués en gris. La séquence en acides aminés de la Cry5Ba correspondant à la toxine activée Cry1Aa se compose de 631 acides aminés qui s'étendent entre les résidus 65 à 695. Cette séquence de la Cry5Ba partage une identité de séquence relativement faible de 19 % avec la région de Cry1Aa activée. Néanmoins, la présence dans ces deux séquences des quatre blocs conservés

parmi les toxines Cry et leur alignement satisfaisant obtenu a constitué une base raisonnable permettant de déduire un modèle pour le Cry5Ba.

Cry5Ba	65	GKLDYFALTKASISLIGFIPGAEEAVPFINMFVDFVWPKLFGANTEGKDQ	
Cry1Aa	33	YTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQ	
		..* . . . * * .*** * * . *	
Cry5Ba	115	QLFNAIMDAVNKMVDNKFLSYNLSTLNKTIEGLQGNLGLFQNAIQVAICQ	
Cry1Aa	83	-LINQRIEEFAR---NQAISRL-----GLSNLYQIYAESFRE----	
		* . * * . * . * . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	165	GSTPERVNFQDQCTPCNPNQCKDDLDRVASRFDTANSQFTQHLPEFKNP	
Cry1Aa	117	-----WEADPTNPALREEMRIQFN-DM-NSALTTAIPLLAV-	
		. * * . . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	215	WSDENSTQEFKRTSVELTLPMYTTVATLHLLLYEGYIEFMTKWNFNHNEQY	1
Cry1Aa	151	---QNY-QVP-----LLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVGQRWGFDAAT-	
		. * * . . * . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	265	LNNLKVELQQLIHSYSETVRTSFLQFLPTLNNRSKSSVNAYNRYVRNMTV	2
Cry1Aa	189	INSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTL	
		. * . . * . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	315	NCLDIAATWPTFDTHNYHQGGKLDLTRIILSDTAGPIEEYTTGDKTSGPE	
Cry1Aa	239	TVLDIVALFSNYDSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIE	
		*** * . . * . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	365	HSNITPNNILDTPSPT-YQHS---FVSVDSIVY--SRKELQQLDIATYST	
Cry1Aa	289	QNIHQPHLMDILNSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFGSGPEFAFPLF	
		. . * . . * * * * . * . * . * . *	
Cry5Ba	409	NNSNNCHPYGLRLSYTDGSRDYGDNPQDFT---TSNNNYCHNSYTAPIT	
Cry1Aa	339	GNAGNAAPPVLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLGD--T	
		* . * * * . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	456	LVNARHLYNAKGSQNVESLVVSTVNGGSGSCICDAWINYLPRPPQTSKNE	
Cry1Aa	387	EFSFASLTTLNP-----STIYRQRGTVDSLDVI----PPQDNSVP	
		. * . * . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	506	SRPDQKINVLYPITETVNK-GTGGNLGVI--SAYVPMELVPENVIGDVNA	
Cry1Aa	423	PRAGFSH-RLSHVTMLSQAAGAVYTLRAPTFWQHRSAEFNIIIPSSQI-	3
		. * . * . * . * . * . * . * . *	
Cry5Ba	553	DTKLPLTQLKGFPFEKYGSEYNNRGISLVREWINGNNAVKLSNSQSVGIQ	c
Cry1Aa	471	-TQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPFTGGDILRRTSPGQ---IS-TLRVN--	
		* . *** * . * . *	
Cry5Ba	603	ITNQTKQKYEIRCRYASKGDNVYFNVLDSENPFNRNSISFGSTESSVGV	4
Cry1Aa	514	ITAPLSQRYRVRIRYASTT-NLQFHTSIDGRPI--NQGNFSATMSSGSNL	
		** * . * . * * * * . * . * . * . *	
Cry5Ba	653	QGENGKYILKSITTVEIPA-GSFYV--HITNQGSDDLFLDRIEFVP	5
Cry1Aa	561	QS--GSFRTVGFTTFFNFNSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVT	
		* . * . . * * . * . * . * . * . *	

Figure 4.1. Alignement des séquences des protéines Cry5Ba et Cry1Aa utilisé pour la modélisation de la structure 3D de la Cry5Ba. Les symboles (*) et (.) indiquent les résidus identiques et conservés, respectivement. Les blocs conservés (1, 2, 3, 4, 5), ainsi que le bloc consensus (c) conservé uniquement dans les toxines nématocides sont indiqués en gris.

Cet alignement a été soumis au serveur de modélisation par homologie automatisée Swiss-Model accessible sur le site internet <http://swissmodel.expasy.org/>, qui a renvoyé par la suite le modèle prédit 3D de Cry5Ba. Ce modèle est présenté superposé à la structure 3D élucidée de la Cry1Aa à la **Figure 4.2**. La validité du modèle a été testée avec le logiciel PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Le diagramme de Ramachandran a indiqué que 97 % des acides aminés de la structure obtenue possèdent des angles dièdres ϕ et ψ (impliquant respectivement les atomes C-N-C $_{\alpha}$ -C et N-C $_{\alpha}$ -C-N du squelette protéique) se situant en dedans des zones de conformations permises. La structure modèle de la Cry5Ba obtenue est en accord avec la structure générale à trois domaines des autres toxines Cry. Le modèle Cry5Ba possède trois domaines composés respectivement des résidus 65 à 329 (domaine I), 330 à 542 (domaine II) et 543 à 695 (domaine III). Le domaine I est composé de sept hélices α avec $\alpha 5$ localisée au centre et entourée par les autres hélices, et de deux petits feuillets β se situant entre les deux dernières hélices. Le domaine I possède donc un repliement général similaire à celui de Cry1Aa, une caractéristique hautement conservée parmi les toxines Cry et permettant de prédire un rôle similaire dans la formation de pores. Le domaine II se compose de trois feuillets β de quatre brins antiparallèles formant la structure de prisme β . Étant donné que la Cry5Ba a une séquence plus longue que Cry1Aa, certaines des hélices du domaine I, des boucles des domaines II et III, ainsi que des feuillets β sont plus longs que celles de Cry1Aa. Cela pourrait entraîner des différences dans la reconnaissance des récepteurs.

Très récemment, la structure 3D à une résolution de 2.3 Å de la toxine Cry5Ba activée par l'élastase a été déposée au Protein Data Bank sous le code 4D8M le 20 décembre 2012, suite à sa publication par Hui *et al.* (2012). Elle est constituée des résidus 112 à 698 et

possède un repliement structural à trois domaines (**Figure 4.2C**) qui ressemble à celui des protéines Cry insecticides et diffère peu du modèle établi ici par homologie. En raison de l'activation par élastase, la protéine Cry5Ba ne possède pas les résidus 171 et 172 dans la boucle reliant les hélices 3 et 4. La Cry5Ba ainsi activée est composée de deux chaînes polypeptidiques (112 à 170 et 173 à 698) reliées par des ponts disulfures. Le domaine I de la structure élucidée Cry5Ba est composé des résidus 112 à 328 constituant cinq hélices α et qui correspondent aux cinq dernières hélices α_3 à α_7 de la Cry1Aa activée. L'hélice 5 de Cry5Ba se situe au centre du domaine I. Le domaine I de la Cry5Ba élucidée se superpose très bien aux domaines I des toxines insecticides Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3B1, Cry4Aa, Cry4Ba et Cry8Ea1 (Hui *et al.*, 2012). Le domaine II de la structure élucidée de Cry5Ba est composé des résidus 341 à 541 et possède un repliement en forme de prisme β , similaire à celui des autres protéines Cry. Parmi les trois domaines de Cry5Ba, le domaine II est structuellement le plus différent par rapport aux domaines II des protéines Cry insecticides mentionnées ci-dessus. Ce domaine est d'avantage similaire à la structure de la lectine de banane BanLec qui lie aussi les glycolipides (Hui *et al.*, 2012). Ceci suggère que ce domaine joue un rôle important dans la liaison de la toxine Cry5Ba aux récepteurs glycolipides. Le domaine III de Cry5Ba s'étend des résidus 542 à 698 constituant deux feuillets β antiparallèles de quatre brins antiparallèles chacun formant la structure connue comme sandwich β , de deux autres feuillets β ainsi que de deux petites hélices de type α -3₁₀ se situant perpendiculairement par rapport au sandwich β . Ce domaine est structuellement très semblable aux domaines III des autres protéines Cry. Le degré de similarité est supérieur à celui des domaines II mais inférieur à celui des domaines I. Le domaine III de la Cry5Ba est aussi structuellement similaire à des protéines liant les glycolipides comme l'enzyme β -agarase. Ceci suggère que

le domaine III de Cry5Ba joue aussi un rôle dans la reconnaissance des récepteurs glycolipides. Il a été démontré que la toxine Cry5Ba ainsi activée se lie aux glycolipides extraits des nématodes *Pristionchus pacificus* et *C. elegans* (Hui *et al.*, 2012). En plus, la protoxine Cry5Ba se lie aussi avec une spécificité équivalente à celle de Cry5Ba activée, mais avec une plus faible affinité, suggérant que l'activation protéolytique de Cry5Ba n'est pas obligatoire pour sa liaison aux récepteurs glycolipides mais qu'elle augmente l'affinité de cette liaison. Les sites de liaison de Cry5Ba aux récepteurs glycolipides se trouvent dans les boucles reliant les feuillets $\beta 1$ à $\beta 2$ et $\beta 11$ à $\beta 12$ du domaine II (Hui *et al.*, 2012).

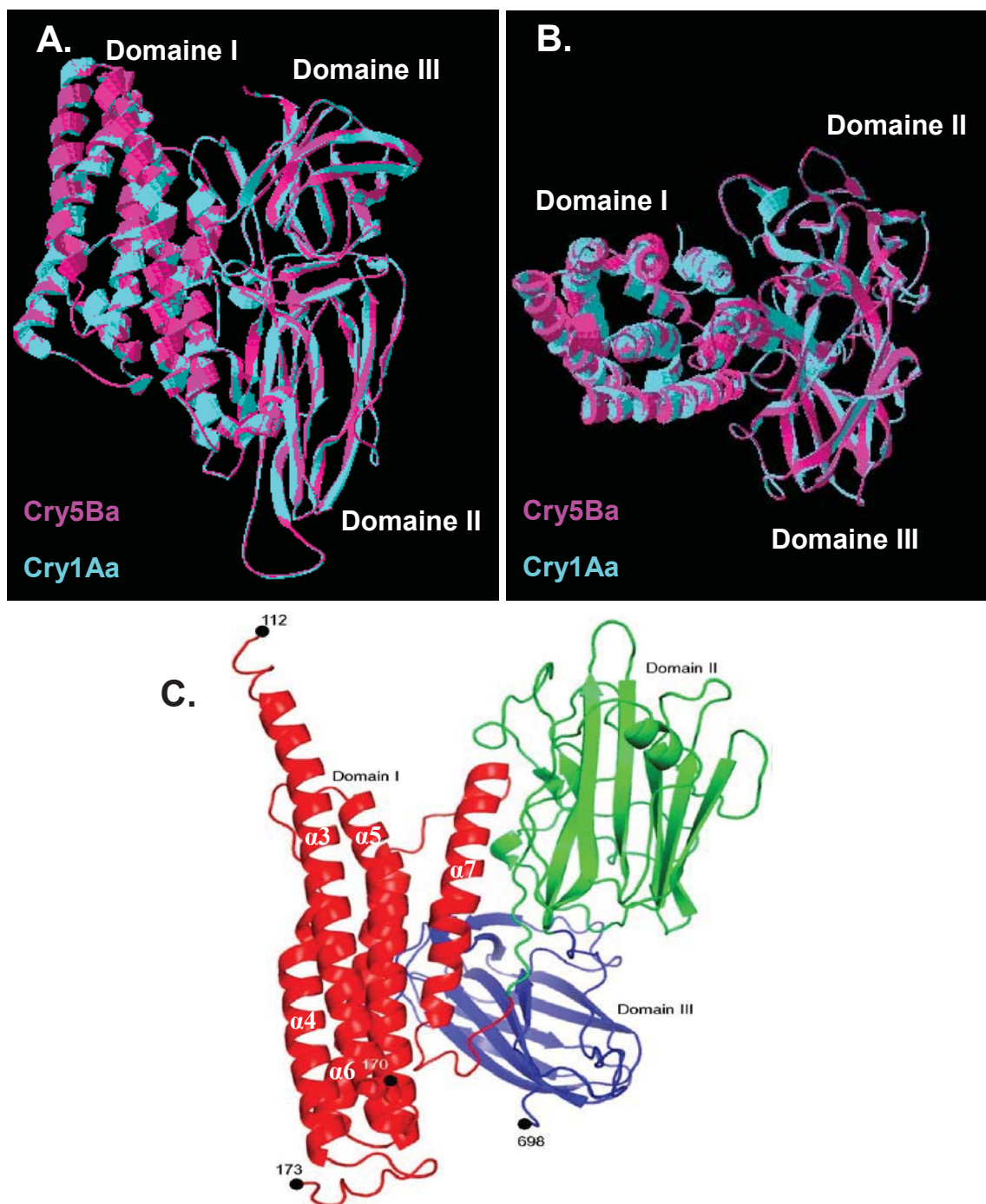


Figure 4.2. Superposition de la structure 3D modèle de Cry5Ba (en mauve) avec la structure 3D élucidée de Cry1Aa (en bleu clair). **A.** Vue latérale. **B.** Vue de dessus. **C.** Structure tridimensionnelle élucidée de Cry5Ba activée (vue latérale) résolue à 2.3 Å (adaptée de Hui *et al.*, 2012).

Le modèle structurel de la Cry5Ba obtenu dans ce mémoire (au début de 2012) est en bon accord avec la structure élucidée de la Cry5Ba activée. En particulier, dans la structure élucidée comme dans notre modèle, l'hélice 3 est la plus longue, mais elle comporte environ 45 résidus alors que celle modélisée n'en a que 30. En plus, les hélices 5 élucidées et modélisées s'étendent entre les résidus 189 à 201 et 187 à 208, respectivement. De plus, dans les deux structures la boucle reliant les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ est la plus longue et la plupart des brins beta sont de longueur comparable. Par contre, les domaines II divergent davantage.

4.2 Formation de pores par Cry5Ba

L'objectif principal de ce travail était de tester la capacité porogène de la toxine nématocide Cry5Ba dans les BLP sans récepteurs, ainsi que d'étudier les propriétés électrophysiologiques des pores formés. Les expériences faites dans les solutions salines de KCl, à la fois à pH acide (6.0) proche de celui de l'intestin de nématode *C. elegans* (Kotze *et al.*, 2005), et à pH alcalin (9.0) typique de l'intestin des larves de lépidoptères, ont démontré pour la première fois que la toxine nématocide Cry5Ba forme des pores dans les bicouches. Les pores ont été observés pour des doses de toxine aussi faibles que 5 à 10 $\mu\text{g/mL}$ (0.07 à 0.14 nM). Dans le cas des protéines exogènes comme la Cry5Ba, l'insertion dans les bicouches est en général difficile et peut même ne pas se produire après plusieurs heures, comme ce fut le cas dans environ la moitié des essais faits dans cette étude. Dans les autres cas, l'activité des protéines insérées devenait relativement stable (apparition répétée de sauts de courant similaires pendant toute la durée des enregistrements) entre 10 à 15 minutes

suivant l'addition de la protéine dans la chambre *cis*, période durant laquelle le courant à travers la bicouche était extrêmement variable.

4.3 Propriétés électrophysiologiques des pores à pH 6.0

Dans des conditions symétriques de KCl 150 mM à pH 6.0, plusieurs sauts discrets de courant à différents niveaux ont été observés après l'ajout de la toxine activée Cry5Ba dans le compartiment *cis* et l'application d'une série de potentiels variant de +60 mV à -60 mV par intervalle de 20 mV.

4.3.1 Conductances

L'analyse des enregistrements des courants ioniques des pores formés par la Cry5Ba a indiqué que ces derniers possèdent différents états de conductances. Les activités qui leurs sont associées sont aussi variables, soit d'une membrane à l'autre pour le même potentiel imposé à la bicouche, soit dans la même membrane pour des potentiels différents. Par exemple, les tracés de courant A et B à la **Figure 4.3** ont été obtenus sur deux bicouches différentes alors que le même potentiel de + 40 mV avait été imposé à ces dernières.

Le tracé A illustre un enregistrement de courant de durée de 80 secondes. Au moins deux niveaux de courants correspondant à une conductance de 243 pS sont présents dans la membrane (niveau 2 et saut de 2 à 3). Au début du tracé A, le niveau du courant correspondant à une conductance de 243 pS passe brièvement (pendant environ 1.15 secondes) par un état de conductance inférieur (ou de sous-conductance) indiqué par le chiffre 1 dans la figure correspondant à une conductance de 128 pS (sauts de 2 à 1 à la **Figure 4.3**)

pour ensuite retourner à un niveau de conductance maximale (niveau 2 dans la figure) pour une durée plus longue d'environ 52 secondes. Aucun saut direct entre les niveaux 3 et 2 ou 3 et **c** (tous les pores fermés) n'a été observé.

En revanche, sur le tracé B obtenu pour une autre membrane mais au même potentiel imposé de +40 mV les sauts de courant observés oscillent entre plusieurs autres niveaux de conductance. Au moins deux grands niveaux correspondant à des conductances de 388 pS (sauts **c** à 1) et 435 pS (saut 1 à 3) ont été observés. Le saut de courant correspondant à une conductance de 388 pS passe plusieurs fois par l'état complètement fermé **c** ainsi que par plusieurs états de conductances inférieures. Ainsi, on observe au moins deux brèves transitions vers l'état de sous-conductance S_1 et de durées respectives de 39 ms et 26 ms, correspondant à une sous-conductance de 159 pS (saut de 1 à S_1). Vers la fin du tracé B, le courant correspondant à la conductance de 388 pS passe par un deuxième état de sous-conductance S_2 de 359 pS. Le symbole * vers le fin du tracé indique un autre état de sous-conductance de 53 pS. De plus, vers la fin du tracé B, on observe deux ouvertures successives à partir du niveau de sous-conductance S_2 et correspondant à une conductance 435 pS. De plus, deux sauts de courant correspondant à la même conductance de 317 pS (sauts de 1 à 2 et de 2 à 4) se trouvent superposés au niveau de courant (conductance de 388 pS) à la toute fin du tracé B. L'analyse plus détaillée a indiqué que les conductances de 317 pS possèdent leur propre état de sous-conductance correspondant à la moitié de leur conductance maximale. Cet état de sous-conductance a cependant aussi été observé en tant qu'une sous-conductance de celle de 388 pS. Ceci suggère donc qu'il est possible que les états de conductance ne soient pas indépendants.

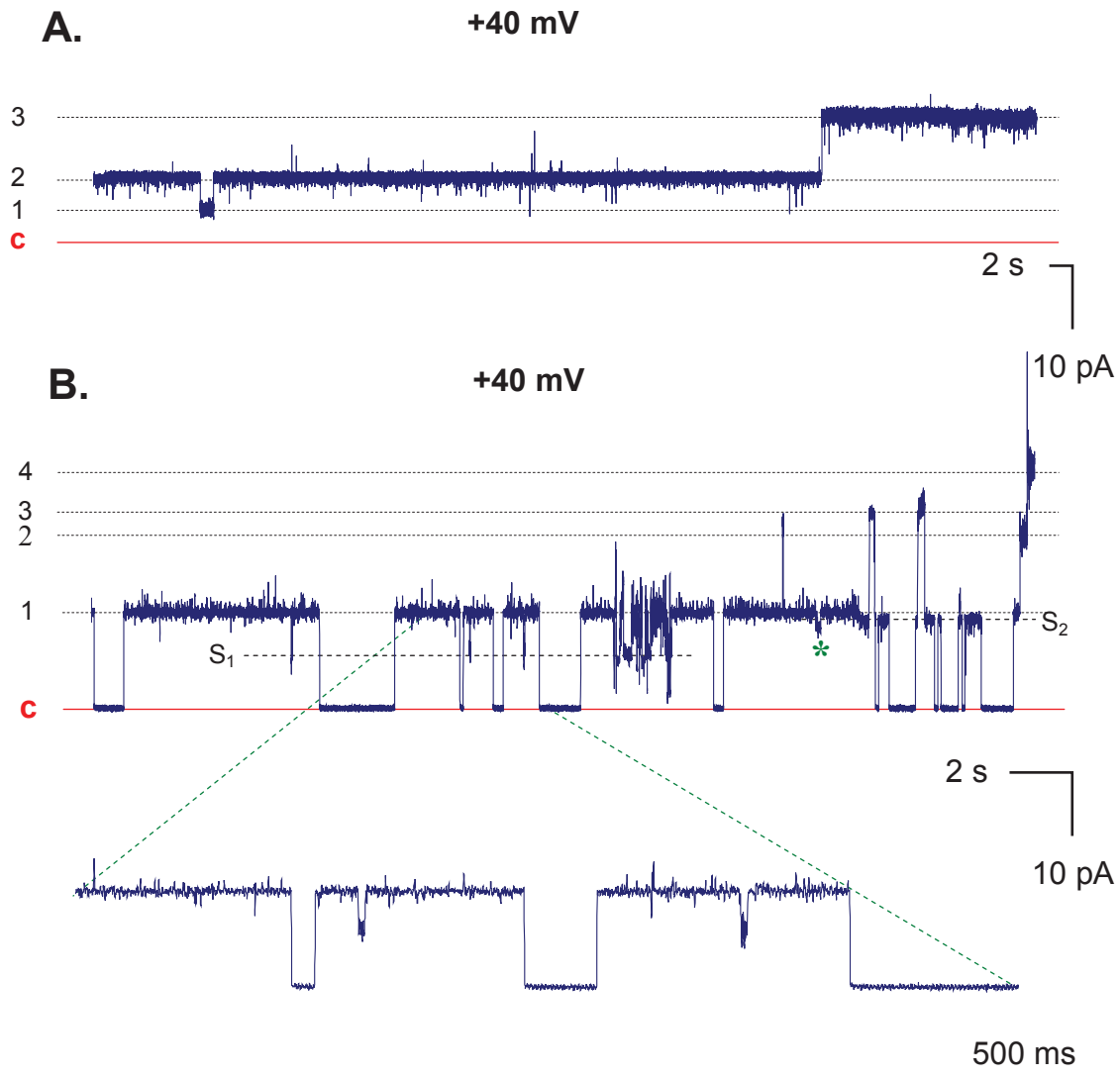


Figure 4.3. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba dans deux bicouches différentes, pour le même potentiel imposé de + 40 mV et en 150 mM KCl à pH 6.0. L'état fermé (0 pA) est indiqué par la lettre **c** et la ligne continue. Les niveaux de transition du courant sont représentés par les lignes en pointillés. **A.** La conductance de 243 pS correspondent aux sauts de **c** à 2 et 2 à 3 et celle de 128 pS au saut de 2 à 1. **B.** La conductance de 388 pS corresponde aux sauts de **c** à 1, celle de 435 pS aux sauts de 1 à 3, celle de 317 pS aux sauts de 1 à 2 et 2 à 4, celle de 159 pS aux sauts de 1 à S₁ et enfin celle de 27 pS aux sauts de 1 à S₂. L'agrandissement sous le tracé B illustre des transitions à échelle temporelle étendue. Le symbole * indique un état de sous-conductance d'environ 53 pS.

Ces multiples états de conductance observés sur le tracé B sont identifiables sur l'histogramme d'amplitude du courant montré à la **Figure 4.4**. Cet histogramme a été ajusté par une somme de fonctions gaussiennes ce qui a permis d'identifier au moins sept pics. Ces derniers permettent de déduire les amplitudes moyennes du courant pour chacun des états qu'ils représentent.

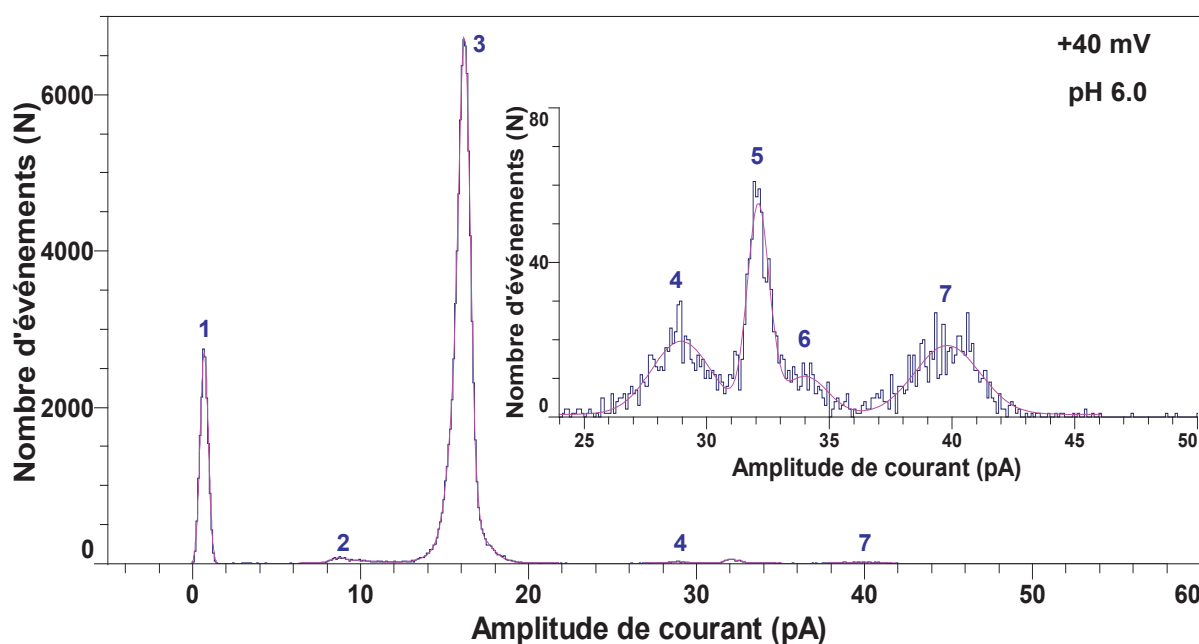


Figure 4.4. Histogramme d'amplitude du courant de l'expérience représentée par le tracé B de la **Figure 4.3**. La ligne continue en magenta indique le lissage des distributions gaussiennes individuelles. Les valeurs moyennes des pics identifiés sont les suivantes : pic 1 (état complètement fermé **c**, 0.6 ± 0.003 pA), pic 2 (niveau S_1 , 8.4 ± 0.1 pA), pic 3 (niveau 1, 15.8 ± 0.6 pA et 16.2 ± 0.001 pA), pic 4 (niveau 2, 28.7 ± 0.07 pA), pic 5 (niveau 3, 32.1 ± 0.02 pA), pic 6 (33.9 ± 0.9 pA) et pic 7 (niveau 4, 39.8 ± 0.07 pA). Le pic 3 est légèrement asymétrique en raison de la sous-conductance S_2 correspondant à un pic centré en 15.8 ± 0.6 pA. Par souci de clarté, les pics 4 à 7 représentant les événements moins fréquents sont illustrés sur une échelle agrandie dans le cartouche et ont été obtenus par le lissage au moyen de quatre fonctions gaussiennes.

La présence de cette gamme d'états de conductance qui varie d'une membrane à l'autre exige donc d'analyser plusieurs expériences. Ainsi, lorsque différents potentiels ont été imposés à la même membrane, les états de conductances changent d'un potentiel à l'autre. Un exemple pour des potentiels de -60 mV, -40 mV, +20 mV et -20 mV est montré sur les tracés de courant présentés à la **Figure 4.5** et **Figure 4.6**.

Le tracé A de la **Figure 4.5** illustre un enregistrement de courant de 35 secondes obtenu à -60 mV. Plusieurs niveaux de conductance ont été observés. Au début du tracé, le saut de courant entre les niveaux 3 et 5 correspond à une conductance de 132 pS, dure 175 ms et semble correspondre à un état de sous-conductance du pore de conductance égale à 172 pS (saut de 1 à 5). Ce dernier a aussi été observé sous la forme d'une ouverture indépendante sur le même enregistrement (non illustré sur le tracé A). Le grand saut du courant observé vers le milieu du tracé A résulte de la superposition de sauts de courant correspondant à deux conductances de 409 pS (saut de 1 à 6) et 132 pS (saut de 6 à 7). De plus, au moins deux autres niveaux de conductance identiques d'environ 66 pS (sauts de 3 à 5 et 2 à 3) sont présents dans la membrane. L'analyse détaillée de cet enregistrement a indiqué que chacun de ces pores possède un niveau de sous-conductance correspondant à environ 34 pS. Deux ouvertures indépendantes (sauts entre 3 à 4) de durée respectives de 152 et 259 ms et correspondant à la même conductance de 34 pS, sont observées à la fin du tracé. Des petits transitions de conductance d'environ la moitié de cette dernière ont aussi été observées (non illustrées sur le tracé). Tout porte à croire que les états de conductance et ceux de sous-conductance ne sont pas indépendants et que les grandes conductances résultent de l'ouverture simultanée de plusieurs petits pores similaires de conductance d'environ 17 pS.

À -40 mV, dans la même membrane d'autres niveaux de conductance ont été observés sur une portion de l'enregistrement de 15 secondes montrée dans le tracé B (**Figure 4.5**). Au moins quatre niveaux distincts de courants sont observés tout au début du tracé B, qui résultent de la superposition de sauts de courant correspondant à des conductances de 212 pS (sauts de 3 à 5 et 7 à 8) et de 305 pS (sauts de 5 à 6 et 8 à 9). La conductance de 212 pS a été observée plusieurs fois tel qu'illustré sur l'agrandissement accompagnant le tracé B. L'agrandissement montre une portion de 1 s du tracé B à une échelle temporelle étendue et dans laquelle le saut de courant correspondant à la conductance de 212 pS est observé plusieurs fois. À la fin du tracé B, une fermeture qui dure 560 ms et correspond à une conductance de 143 pS (saut de 2 à 3) a été observée. La plus petite transition qui a pu être identifiée dans cette expérience possédait une conductance d'environ 34 pS (sauts de 5 à 6). Cette dernière a été observée en tant que niveau de conductance indépendant superposé au niveau principal de conductance (niveau 3) mais aussi en tant qu'un état de sous-conductance.

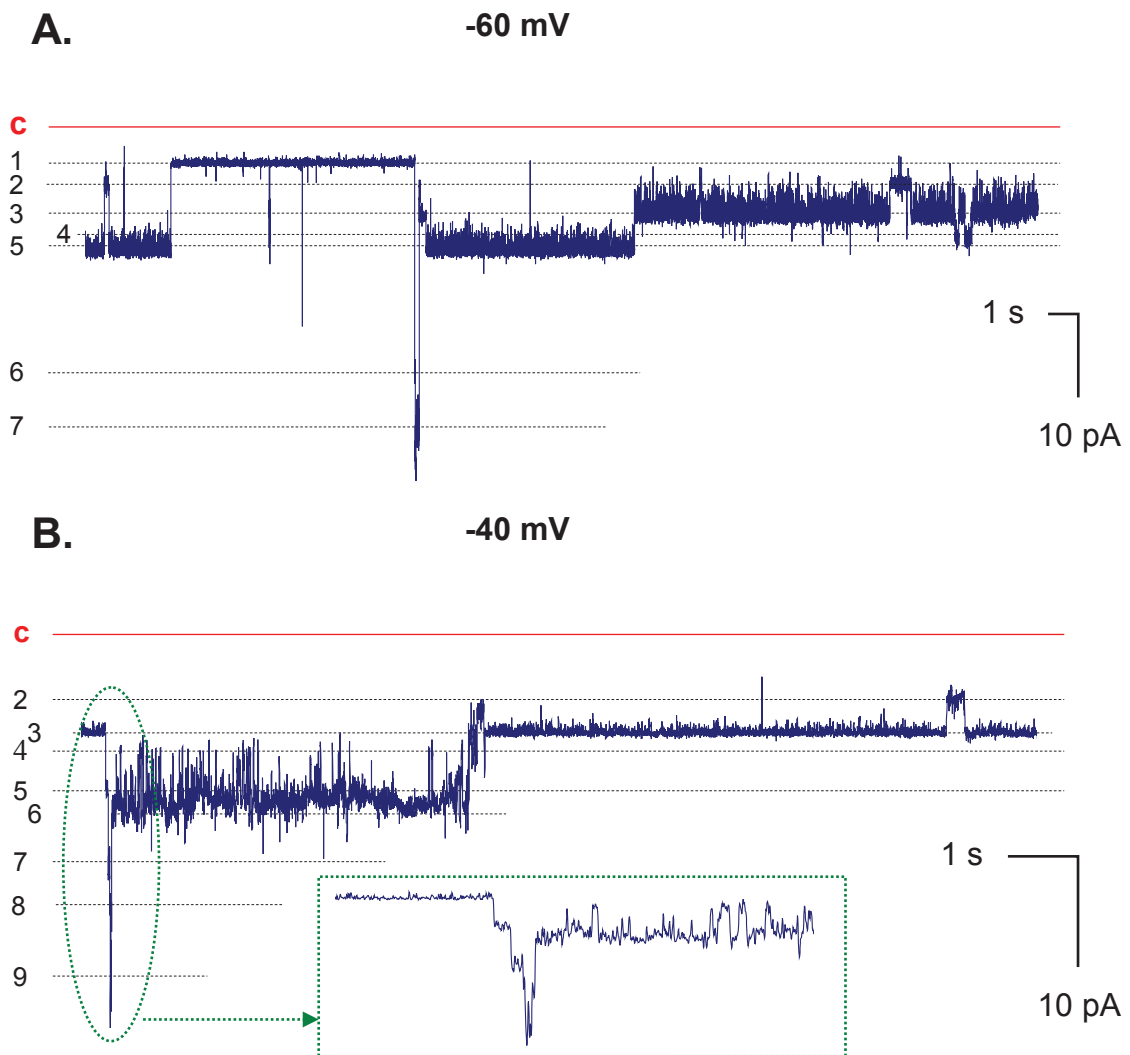


Figure 4.5. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0. **A.** (-60 mV). Les conductances correspondantes sont : 132 pS (sauts de 3 à 5 et 6 à 7), 172 pS (saut de 1 à 5), 409 pS (sauts de 1 à 6) et 34 pS (sauts de 3 à 4). **B.** (-40 mV). Les conductances correspondantes sont : 212 pS (sauts de 3 à 5 et 7 à 8), 305 pS (sauts de 5 à 6 et 8 à 9), 143 pS (sauts de 2 à 3) et 34 pS (sauts de 5 à 6).

À un potentiel positif de 20 mV (tracé C, **Figure 4.6**) imposé à la même bicouche que celle dans les tracés A et B de la **Figure 4.5**, l'enregistrement de courant se caractérise par un saut fréquent au niveau principal 1 correspondant à une conductance de 313 pS ainsi que des ouvertures rapides résultant essentiellement de la superposition de plusieurs niveaux de différentes conductances. Le niveau principal 1 correspond à une conductance de 313 pS. Les plus petits sauts de courant identifiables correspondent à une conductance de 84 pS (sauts de 1 à 2) lorsque les sauts de 1 à 3 correspondent à environ 168 pS (soit le double de 84 pS). Les sauts de courant entre les niveaux 3 et 4 observés au début du tracé C correspondent à environ 303 pS alors que la grande ouverture observée vers la fin du tracé C (saut de 1 à 5) résulte de la superposition de deux sauts de courant correspondant à une conductance de 303 pS. Plusieurs transitions intermédiaires entre ces deux niveaux de courant ainsi que d'autres niveaux plus élevés, tels que les niveaux 6 et 7, ont été observées.

En revanche, à un potentiel négatif de la même amplitude de 20 mV (tracé D, **Figure 4.6**), imposé à la même bicouche qu'en C (**Figure 4.6**), un seul niveau principal de courant correspondant à une conductance principale de 223 pS (saut de c à 2) a été observé durant un enregistrement de durée totale de 64 secondes. Le pore se ferme pendant seulement environ 3 secondes à un niveau de sous-conductance par un saut de courant vers le haut correspondant à 158 pS.

Cependant, des sauts de courant ioniques correspondant à des conductances similaires ont pu être identifiés pour différents potentiels imposés à la même bicouche. Un exemple est présenté aux **Figure 4.7** et **Figure 4.8**. Les tracés de courant durent chacun 3 secondes et ont été extraits des enregistrements d'environ 1 minute.

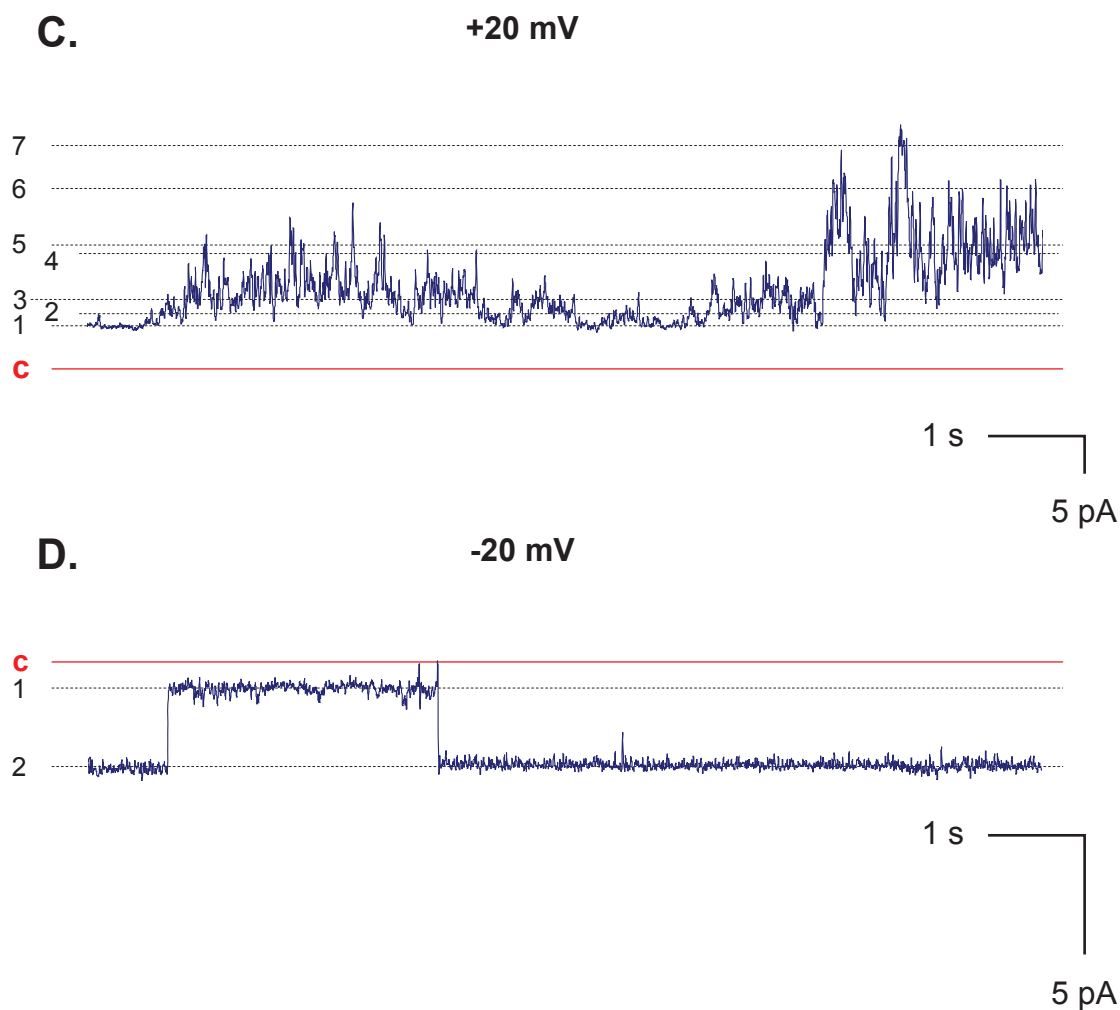


Figure 4.6. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche qu'en **Figure 4.5**, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0. **C.** (+20 mV). Les conductances correspondantes sont : 313 pS (sauts de **c** à 1), 84 pS (sauts de 1 à 2), 168 pS (sauts de 2 à 3), 303 pS (sauts de 3 à 4) et 606 pS (sauts de 1 à 5). **D.** (-20 mV). Les conductances correspondantes sont : 223 pS (niveau 2) et 158 pS (saut de 1 à 2).

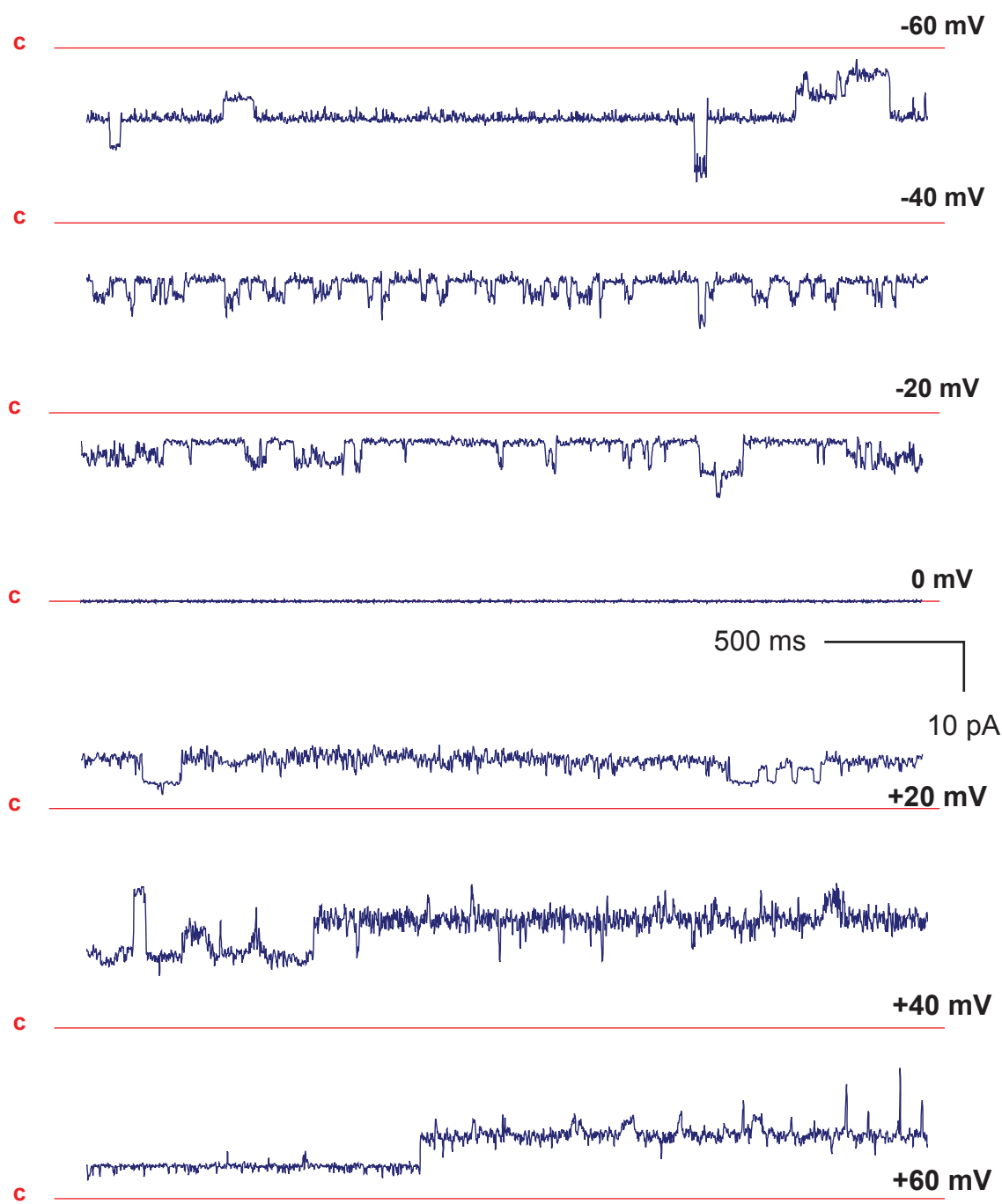


Figure 4.7. Tracés des courants ioniques à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0. La barre d'échelle est la même pour tous les tracés.

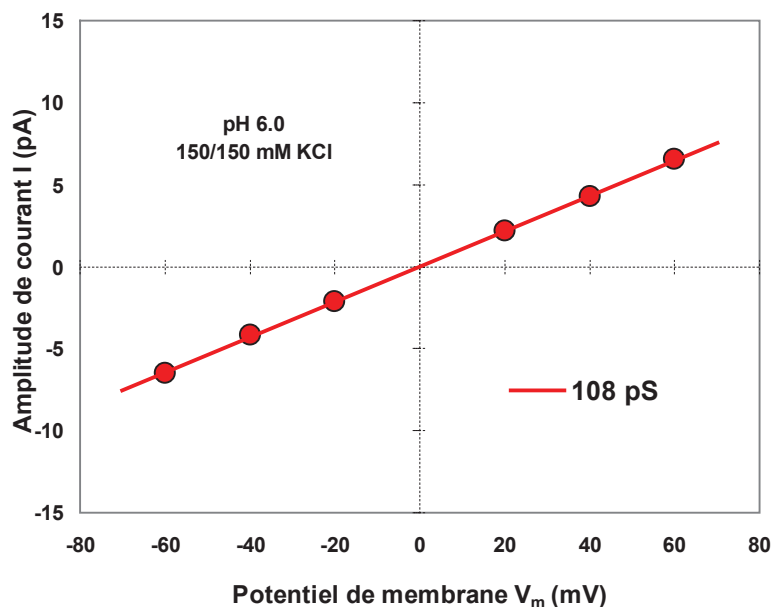


Figure 4.8. Relation courant-potentiel (I-V) pour les sauts de courant correspondant à la conductance principale que l'on observe sur les tracés présentés à la **Figure 4.7** pour tous les potentiels appliqués sur la même bicouche, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0. Les points représentent l'amplitude des sauts de courant mesurés expérimentalement sur ces tracés. La pente de la droite de régression linéaire tracée sur les points expérimentaux correspond à la valeur de la conductance indiquée sur le graphique.

4.3.2 Relations courant-potentiel (I-V)

L'activité des pores était variable d'une expérience à l'autre. Cependant, des sauts de courant uniques ont été identifiés par l'analyse de 8 expériences (sur un total de 15 dans lesquelles l'incorporation de la toxine dans la bicouche a été obtenue). Cela a permis de tracer les relations courant-potentiel (I-V) présentés à la **Figure 4.9**. En conditions de pH acide de

6.0, la Cry5Ba forme des pores à conductances multiples variant de 32 ± 1 pS à 330 ± 1 pS. Cependant, des sauts de courant correspondant à des conductances plus petites variant de 17 à 27 pS ont aussi été observés plus fréquemment pour des valeurs de potentiel appliqué supérieures à ± 20 mV.

Plusieurs autres niveaux de conductance représentant des multiples de ces petites conductances ont aussi été observés pour toute la gamme des potentiels imposés aux bicouches mais pas dans toutes les expériences. Ainsi, sur une membrane soumise à un potentiel de + 60 mV (non présentée) des sauts de courant correspondant à des conductances de 63, 133 et 196 pS ont été observés. Les plus petits ont été observés en tant que sauts indépendants se superposant à ceux correspondant à la conductance de 133 pS. Les plus grands pourraient donc correspondre à l'ouverture simultanée des deux pores de conductances inférieures. En revanche, sur une autre membrane soumise au même potentiel de + 60 mV, seul un niveau de courant correspondant à une conductance de 47 pS a été observé. Lorsqu'un potentiel de -60 mV a été imposé à une autre membrane les pores sont restés ouverts à un niveau principal correspondant à une conductance de 205 pS lorsque des transitions de ce niveau à des niveaux inférieurs se font par des fermetures discrètes correspondant à des conductances de 21, 62, 104 et 145 pS.

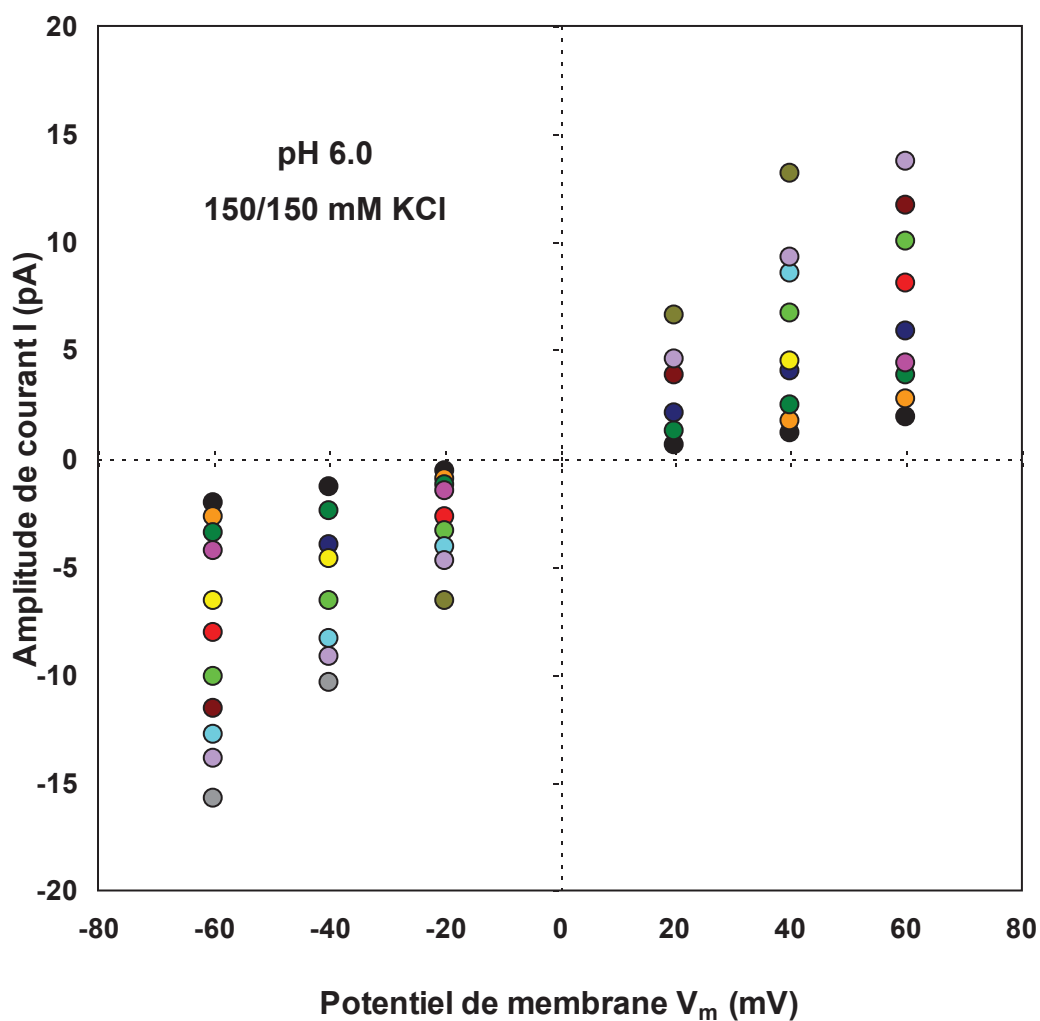


Figure 4.9. Relations courant-potentiel (I-V) des pores formés par la Cry5Ba en solutions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0. Les points représentent l'amplitude moyenne du courant obtenue pour au moins un potentiel imposé dans les différentes expériences. Les barres d'erreur sont plus petites que la taille de symboles représentant les points expérimentaux.

Des grands sauts de courant correspondant à des conductances parfois supérieures à 600 pS (4 expériences sur 8) ont aussi été observés essentiellement pour des potentiels supérieurs à ± 20 mV. Néanmoins, ces grands sauts n'ont été observés qu'à un seul potentiel dans une bicouche par exemple à -60 mV et non à + 60 mV, ou le contraire. L'apparition des sauts de courant correspondant à des petites conductances et leurs multiples semble être un événement variable d'une expérience à l'autre (**Figure 4.3**, **Figure 4.5** et **Figure 4.6**).

Les conductances correspondant aux sauts de courant les plus fréquents sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 4.1. Les conductances correspondant aux sauts de courant les plus souvent observés expérimentalement pour les pores formés par la Cry5Ba en conditions de solutions ioniques symétriques de 150 mM KCl à pH 6.0. Le nombre d'expériences dans lesquelles des sauts de courant correspondant à une conductance ont été observés pour au moins deux potentiels différents imposés à la même bicouche est indiqué par la lettre N. Ces résultats proviennent de 8 expériences analysables, sur un total de 15 expériences effectuées dans ces conditions.

Conductance \pm E.S.M. (pS)	32 ± 1	46 ± 1	61 ± 1	72 ± 1	100 ± 1	112 ± 2
N	2	5	5	3	4	4
Conductance \pm E.S.M. (pS)	134 ± 0	167 ± 1	194 ± 0	212 ± 2	262 ± 2	330 ± 1
N	6	5	4	4	2	3

N : nombre d'expériences ; E.S.M. : erreur standard de la moyenne.

En résumé, on constate qu'il est possible que les sauts de courant correspondant à des grandes conductances résultent de l'activité d'oligomères formés d'un nombre différent de

petits pores uniformes de conductance égale à 17 pS ou d'agglomérats de ces petits pores en nombre différent qui s'ouvrent et se ferment de manière coopérative.

4.3.3 Cinétique

4.3.3.1 Comportement cinétique

La dynamique temporelle des pores formés par Cry5Ba était variable d'une expérience à l'autre, mais fréquemment, trois types de comportements caractéristiques ont été observés.

D'un part, les enregistrements se caractérisent par des périodes d'ouverture relativement longues à un certain niveau principal de conductance, avec des ouvertures ou fermetures aux différents niveaux de conductance tels qu'illustrées sur le tracé A de la figure précédente **Figure 4.3** ou tout de même sur les tracés A et B de la figure suivante (**Figure 4.10**) enregistrés sur la même bicouche mais pour des potentiels appliqués différents. Par exemple, sur le tracé A (**Figure 4.10**) d'une durée de 25 s, le niveau principal correspond à une conductance de 206 pS, lorsque le saut de courant vers le haut correspond à une fermeture d'environ 1 s et une conductance de 145 pS. Sur le tracé B (**Figure 4.10**) le saut de courant vers le bas correspond à une fermeture d'environ 3.8 s et à une conductance de 104 pS.

D'autre part, sur le tracé C (**Figure 4.10**) obtenu pour le même potentiel qu'en B (**Figure 4.10**) mais sur une membrane différente, de nombreuses ouvertures et fermetures très rapides ont été observées tout au long de l'enregistrement.

Le dernier type de comportement est caractérisé par des enregistrements comportant des ouvertures ou fermetures en forme de « bouffées » de transitions rapides, ou « *flickering* »

», suivie par des périodes où les activités d'ouvertures ou fermetures sont peu fréquentes. Des tracés représentatifs sont illustrés à la **Figure 4.11**. Au début du tracé A, on observe un épisode de bouffée d'activité résultant de différentes ouvertures correspondant à des conductances de 358, 456 et 547 pS qui semblent correspondre à l'ouverture simultanée de deux ou plusieurs pores de conductance unitaire de 57 pS (tracé C, **Figure 4.11**). Ce type de comportement a été principalement observé pour des valeurs élevées du potentiel imposé (± 60 mV) mais pas exclusivement.

D'autres caractéristiques tirées de l'ensemble des expériences comprennent la cinétique parfois plus complexe des pores ainsi que l'observation rare de l'état complètement fermé **c** de tous les pores.

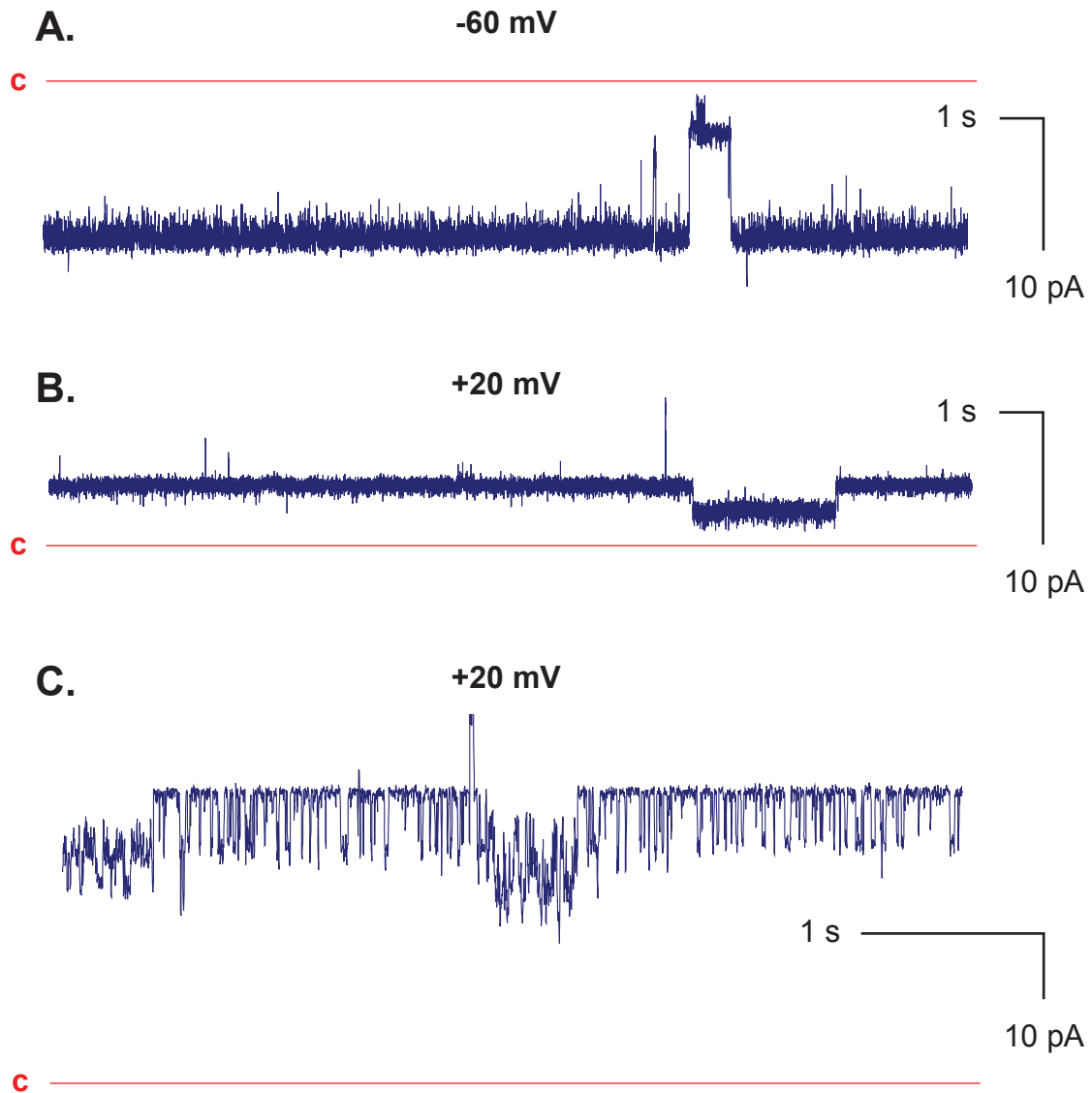


Figure 4.10. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche et pour le même potentiel imposé sur deux bicouches différentes, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0. **A.** et **B.** Tracés de 25 s enregistrés à potentiels différents mais sur la même bicouche illustrant la cinétique lente des pores de Cry5Ba. **C.** Tracé de 5 s enregistré au même potentiel qu'en **B** mais sur une bicouche différente et illustrant la cinétique rapide des pores.

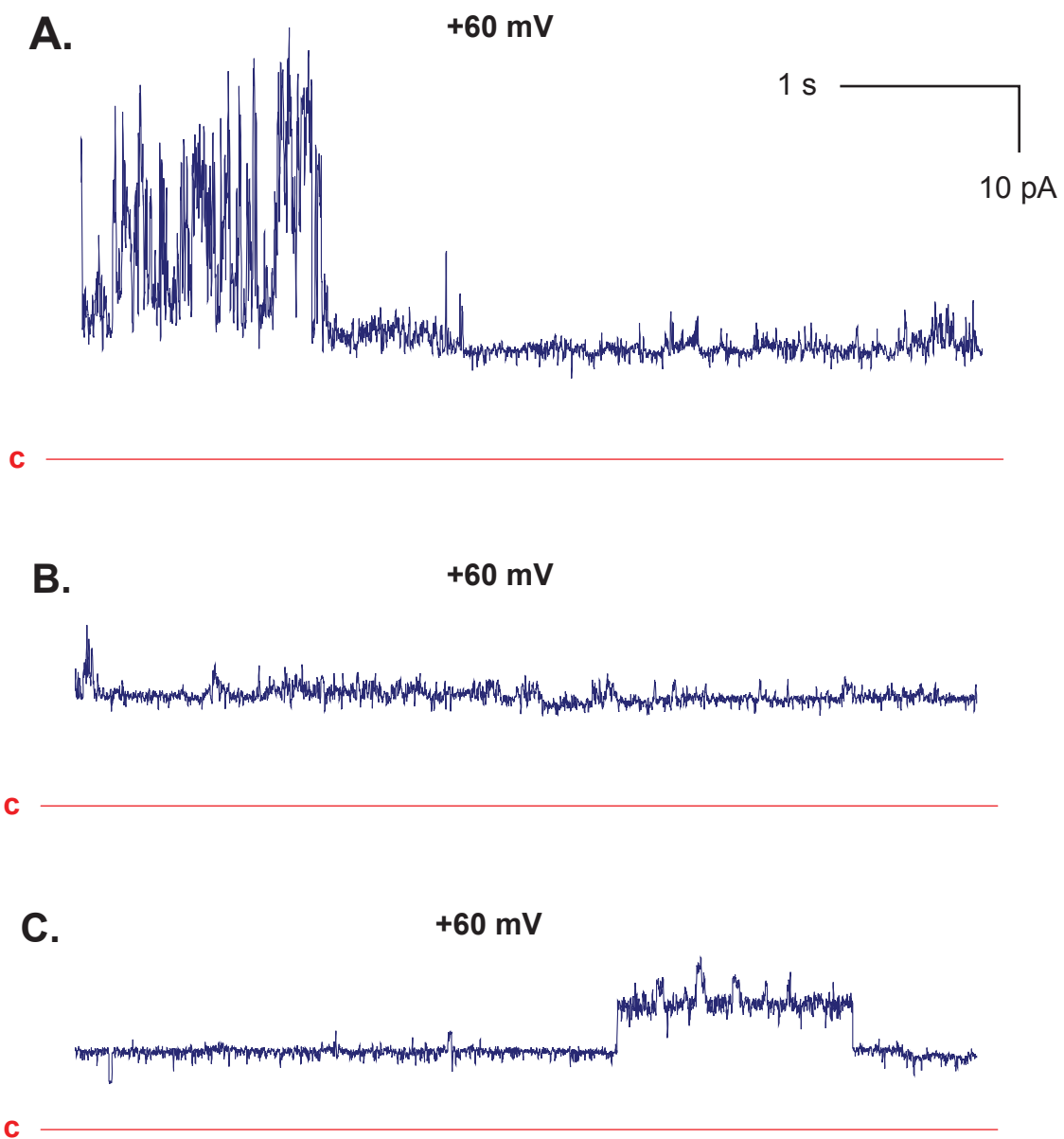


Figure 4.11. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba à + 60 mV, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0. Les trois tracés sont de 5 secondes chacun et proviennent d'un seul enregistrement de courant d'environ 2.5 minutes. La barre d'échelle est la même pour les trois tracés. **A.** Tracé illustrant une bouffée d'activité des pores suivie par une cinétique lente. **B.** et **C.** Tracés illustrant la cinétique très lente de la toxine.

4.3.3.2 Analyse cinétique

Les enregistrements obtenus dans des expériences en BLP se caractérisent généralement par la présence de sauts de courant multiples dont le comportement cinétique a été souvent complexe. Cependant, afin de caractériser les pores du point de vue des temps d'ouverture et de fermeture moyens, l'analyse cinétique a été effectuée sur une partie d'un enregistrement de courant où plusieurs sauts de courant correspondant à une seule conductance de 420 pS ont été observés (deuxième moitié du tracé C, **Figure 4.10**). Les histogrammes des temps d'ouverture et de fermeture sont présentés à la **Figure 4.12**. L'histogramme des temps d'ouverture a été ajusté par une seule exponentielle décroissante. Le temps ouvert moyen est de $\tau_o = 36 \pm 2$ ms. L'histogramme des temps de fermeture pour les sauts de courant correspondant à la même conductance de 420 pS a aussi été ajusté par une seule exponentielle décroissante. Le temps fermé moyen est $\tau_f = 11 \pm 9$ ms. Les fermetures du pore sont donc environ 3 fois plus courtes que les ouvertures. Le pore reste alors ouvert la plupart du temps, ce qui se reflète aussi par sa probabilité élevée d'ouverture p_o de 0.8.

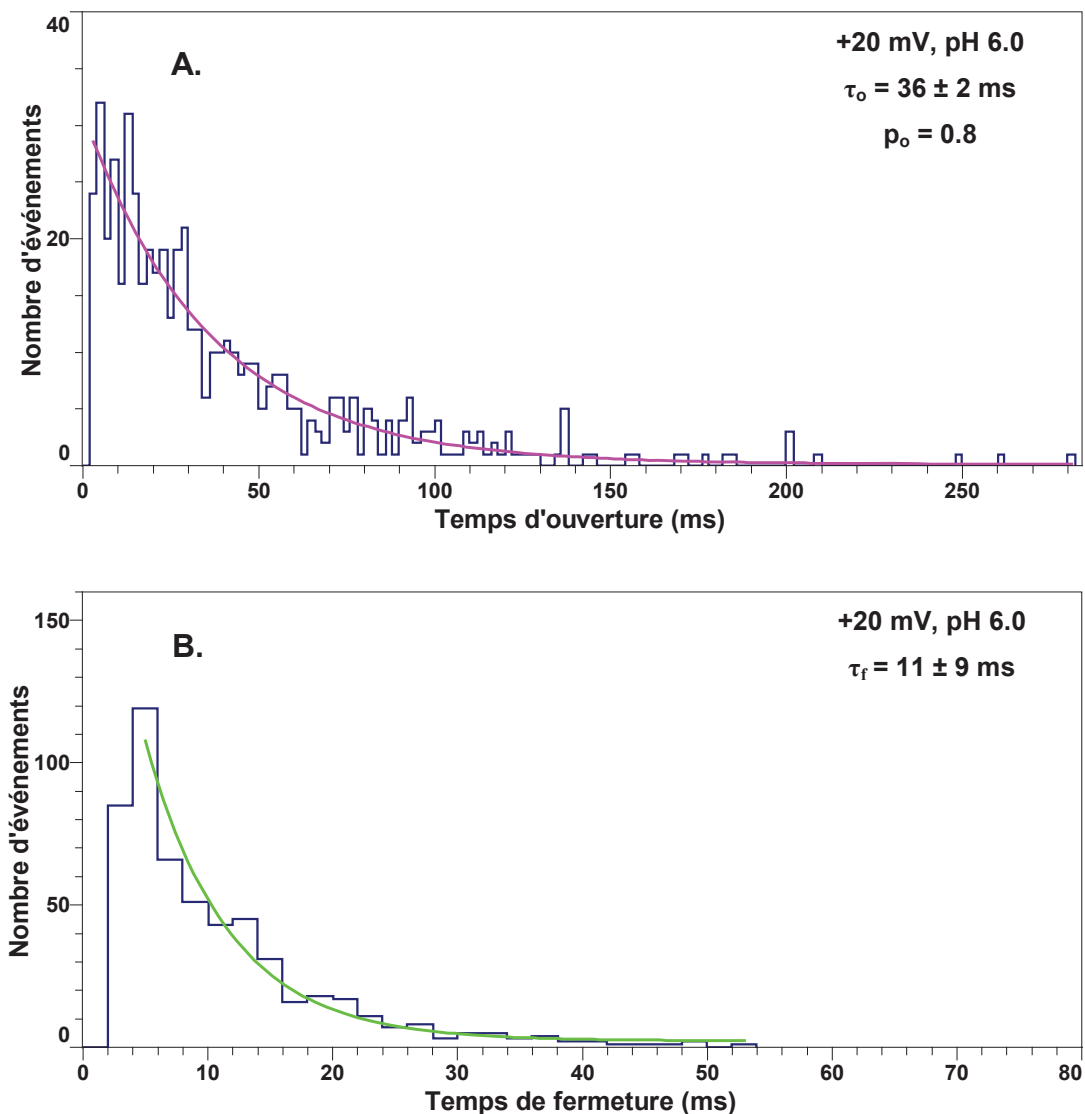


Figure 4.12. Histogrammes des temps de séjours des sauts de courant correspondant à la conductance de 420 pS observée en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0 et à un potentiel de +20 mV dans le tracé C de la **Figure 4.10**. **A.** L’histogramme des temps d’ouverture a été ajusté par une seule fonction exponentielle décroissante (ligne continue mauve) avec temps d’ouverture moyen $\tau_o = 36 \pm 2$ ms. La probabilité d’ouverture du pore est de 0.8. **B.** L’histogramme des temps de fermeture a été ajusté par une seule fonction exponentielle décroissante (ligne continue verte). Le temps de fermeture moyen est $\tau_f = 11 \pm 9$ ms. Un seuil de détection de 2 ms a été utilisé pour les deux histogrammes et la largeur de barres est de 2 ms.

4.3.4 Dépendance au potentiel

La probabilité d'ouverture des pores peut varier en fonction du potentiel imposé à la bicouche. Pour les pores de Cry5Ba, il a été observé que dans certaines expériences les pores sont relativement plus actifs pour des potentiels imposés plus positifs. Un exemple est illustré sur les tracés A (-60 mV) et B (+60 mV) de la **Figure 4.13** qui ont été obtenus à partir de la même bicouche. Plus de pores sont ouverts sur le tracé B.

En revanche, le phénomène contraire a été observé sur les tracés C (+20 mV) et D (-20 mV) de la **Figure 4.6**. Un tel comportement variable a été observé pour toute la gamme des potentiels imposés. Il se peut que cela puisse être attribué à l'ouverture purement stochastique d'un certain nombre de pores, à un certain moment donné pendant l'enregistrement, plutôt qu'à la dépendance au potentiel de leur ouverture lorsque plusieurs pores sont insérés dans la bicouche. D'autres facteurs tels que l'insertion progressive des toxines dans la membrane pourraient être en cause.

Lorsque plusieurs pores de cinétique complexe sont présents dans la membrane, l'évaluation de la dépendance de leur ouverture au potentiel imposé à la membrane devient moins précise.

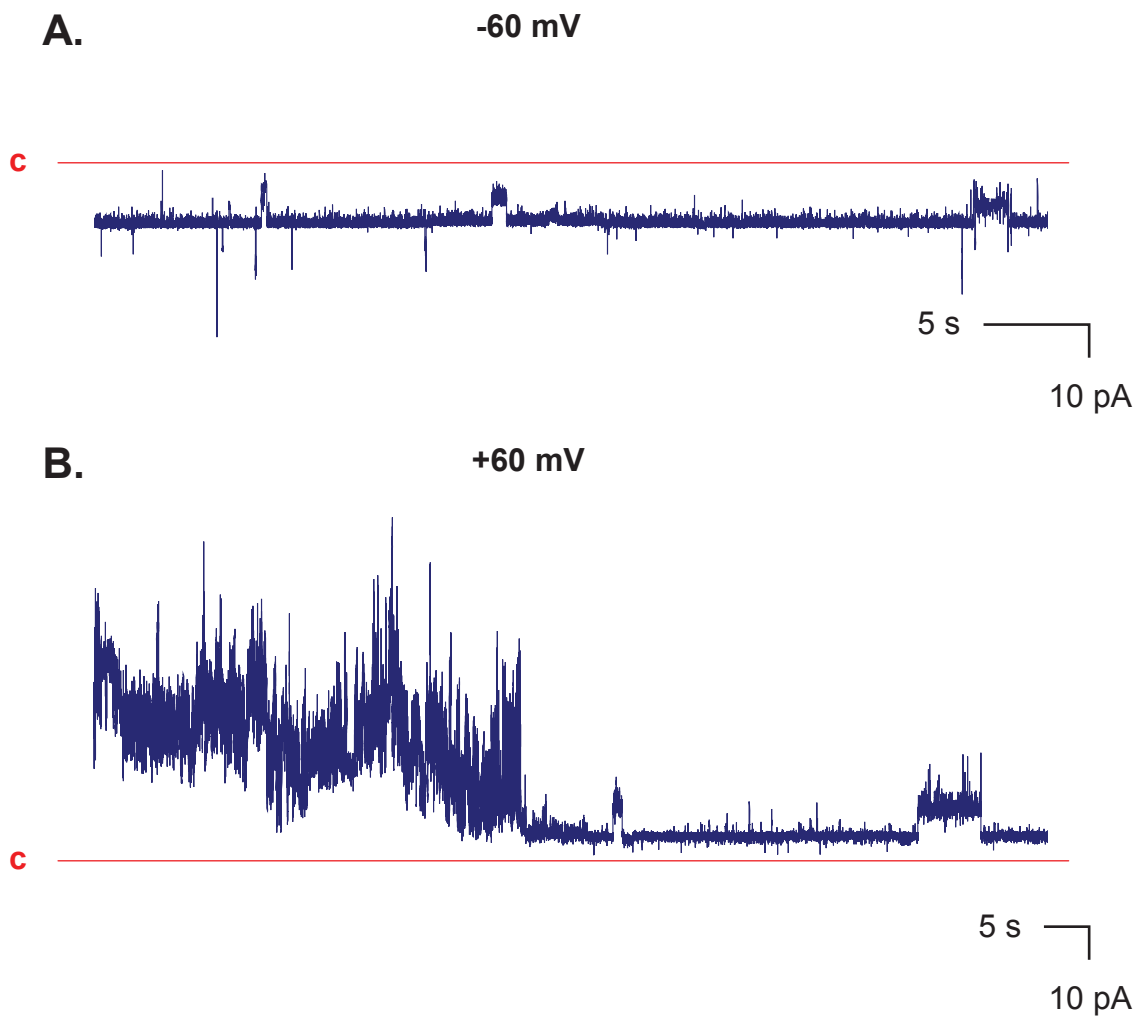


Figure 4.13. Tracés de courant enregistrés en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 6.0, illustrant la variation de la probabilité d'ouverture des pores de Cry5Ba selon les potentiels appliqués à la même bicouche. **A.** Tracé enregistré à -60 mV, illustrant l'activité moins fréquente des pores de Cry5Ba. **B.** Tracé enregistré à +60 mV appliqué à la même bicouche qu'en A, illustrant l'ouverture plus fréquente des pores de Cry5Ba.

4.3.5 Sélectivité ionique

La sélectivité ionique des pores de Cry5Ba à pH acide 6.0 a été déterminée par des expériences effectuées en conditions de solutions asymétriques de KCl de 450/150 mM (*cis/trans*). En faisant varier le potentiel imposé à la bicouche, plusieurs sauts de courant ont été observés à chaque potentiel comme illustré dans les tracés de courants présentés à la **Figure 4.14**. La présence des sauts de courant correspondant à des conductances multiples fait en sorte qu'il est impossible de relier avec précision et sans ambiguïté les points expérimentaux représentant les niveaux de même conductance. Dans ce cas, une valeur unique de potentiel d'inversion ne peut pas être déterminée précisément mais il est possible de trouver une région dans laquelle il se situe. Pour les conditions asymétriques ci-dessus, l'analyse de 5 expériences a permis d'établir une région entre -20 à 0 mV dans laquelle se trouvent les potentiels d'inversion (indiquée par le double-flèche en couleur ambre, **Figure 4.15**). Sur cette figure, les points expérimentaux de même couleur représentent les valeurs des courants unitaires obtenues pour la même bicouche. Le potentiel d'inversion se rapproche donc du potentiel de Nernst pour le potassium, qui est de -27.8 mV (section 3.3.3.3). Les pores de Cry5Ba sont ainsi plus sélectifs au potassium qu'au chlore qui diffuse aussi à travers les pores. Les pores de Cry5Ba ont donc une sélectivité cationique imparfaite. Pour les valeurs E_{inv} entre 0 et -20 mV, les rapports de perméabilités P_{K^+}/P_{Cl^-} varient de 1.0 à 7.1 (équation (2), section 3.3.3.3). Ces taux faibles de perméabilité renforcent le fait que l'ensemble des pores Cry5Ba ne sont pas exclusivement perméables aux cations K^+ mais laissent aussi passer les ions Cl^- .

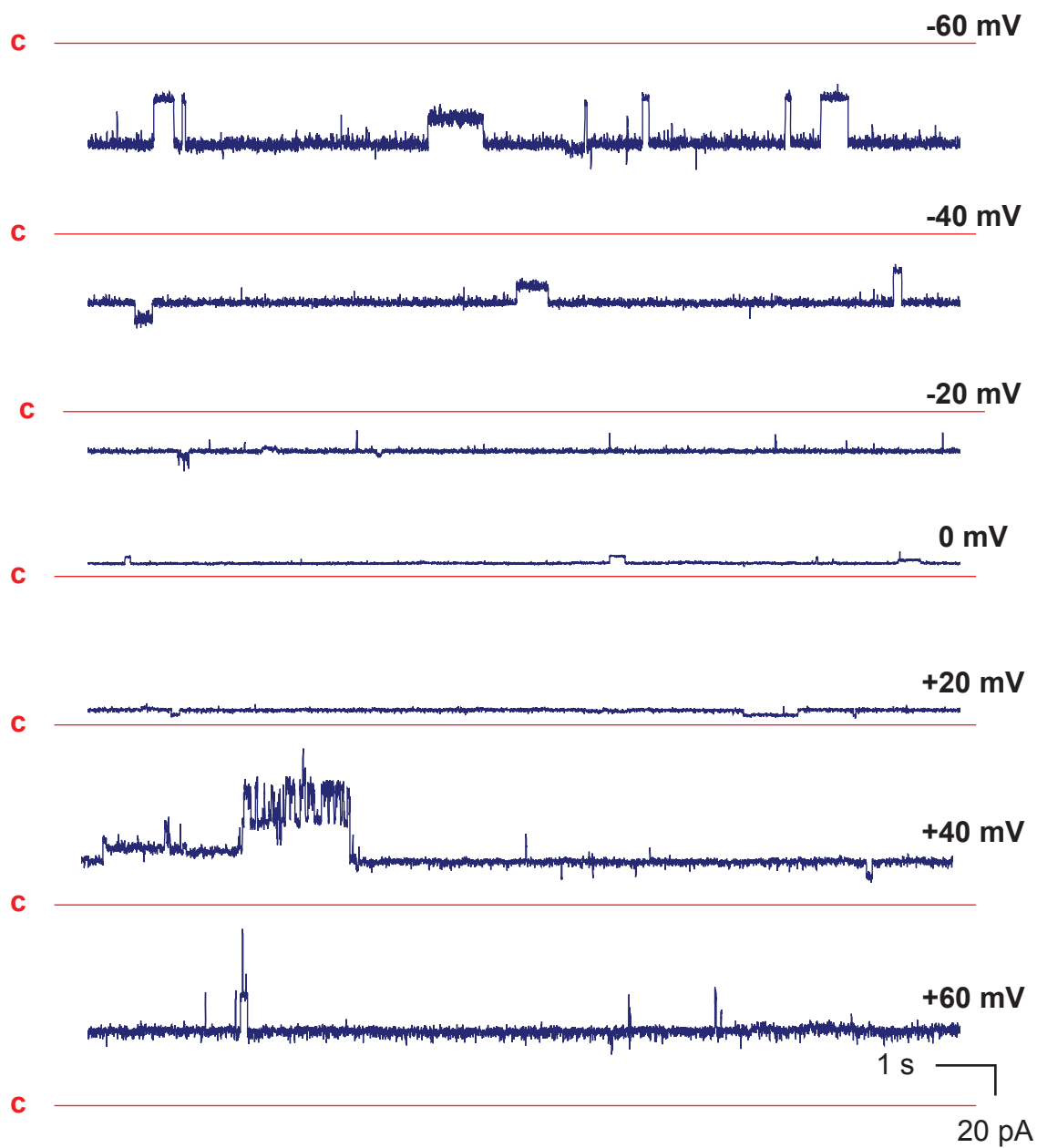


Figure 4.14. Tracés de courants ioniques à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés sur la même bicouche en conditions asymétriques de 450/150 mM de KCl à pH 6.0. La barre d'échelle est la même pour tous les tracés.

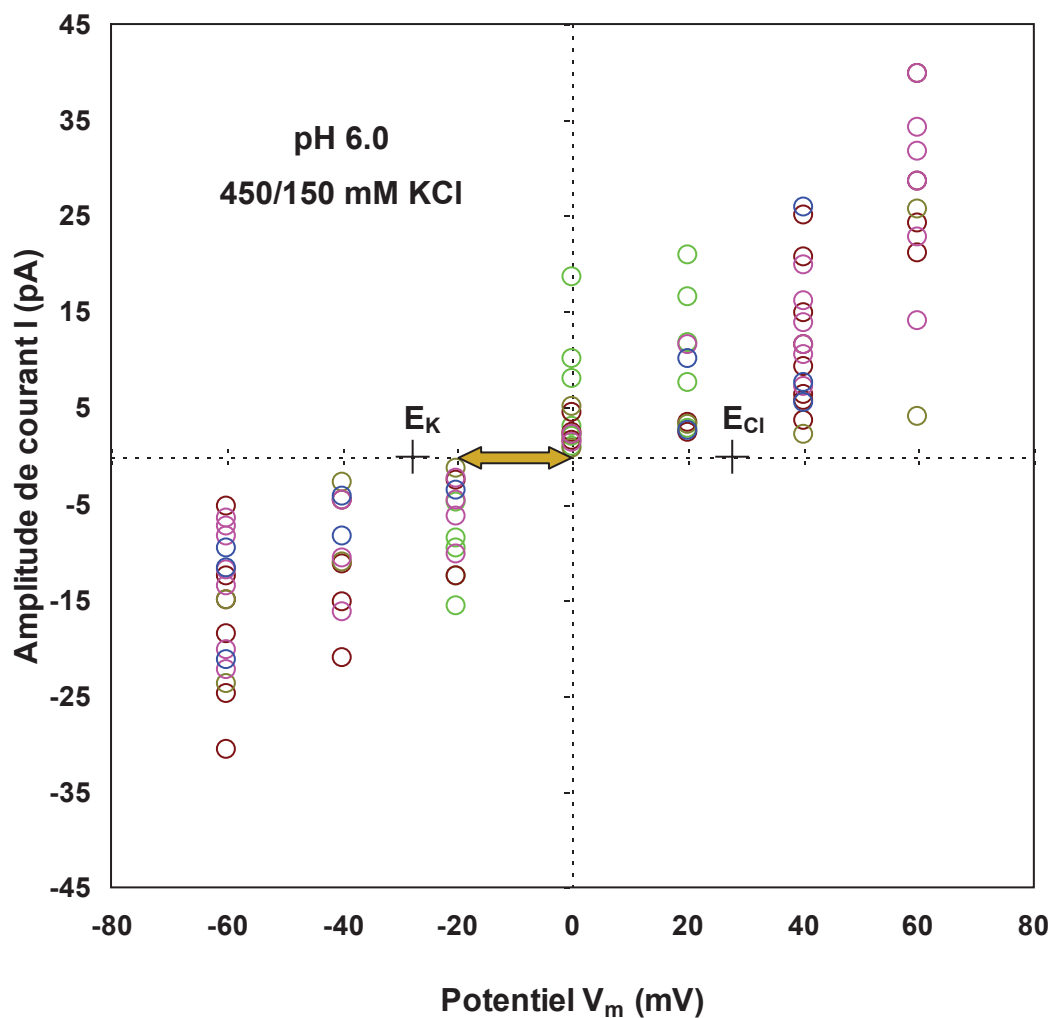


Figure 4.15. Potentiels d'inversion des pores formés par la Cry5Ba en conditions asymétriques de KCl de 450/150 mM (*cis/trans*) à pH 6.0. Les points d'une même couleur proviennent de la même membrane. Les potentiels d'inversion (E_{inv}) se situent dans la région indiquée par la double-flèche en couleur ambre et s'étalent entre -20 à 0 mV. E_K et E_{Cl} indiquent les potentiels d'équilibre de Nernst pour K^+ et Cl^- .

4.4 Propriétés électrophysiologiques des pores à pH 9.0

Les expériences faites en conditions symétriques de KCl de 150/150 mM (*cis/trans*) à pH alcalin de 9.0 ont montré que la Cry5Ba est aussi apte à s'insérer dans les BLP sans récepteurs et y former des pores dans ces conditions. Il a été observé qu'en réponse à l'application d'une série de potentiels variant de +60 mV à -60 mV, les pores formés montrent plusieurs états de conductance et de sous-conductance.

4.4.1 Conductances

L'analyse de 8 expériences dans lesquelles l'activité des pores était plus facile et plus fiable à analyser (sur un total de 20 expériences où l'incorporation de la toxine dans la bicouche a été obtenue), a indiqué que les conductances des pores de Cry5Ba varient non seulement d'une expérience à l'autre mais aussi dans la même bicouche. Cette variation a été constatée dans les valeurs des conductances et leurs fréquences ainsi que dans le comportement cinétique des pores auxquels ces conductances sont associées. Des courants représentatifs obtenus sur trois bicouches différentes sont présentés à la **Figure 4.16** et **Figure 4.17**. Le tracé A de la **Figure 4.16** illustre un enregistrement de courant de 25 secondes obtenu sur une membrane qui a été soumise à un potentiel de - 60 mV. Le saut de courant correspondant à une conductance maximale de 258 pS (saut de 1 à 3) qui a été observé au début de ce tracé possède un niveau de conductance inférieur d'environ 120 pS (saut de 1 à 2). Il passe par ce sous-état plusieurs fois constituant 10 % du temps de l'enregistrement.

L'histogramme d'amplitude du courant de l'expérience représentée par le tracé A est montré à la **Figure 4.16B**. La multitude des états de conductance est indiquée par la présence de cinq pics qui ont été obtenus par le lissage de l'histogramme à la somme de cinq fonctions gaussiennes. Les centres des pics se situent sur les valeurs suivantes : pic 3 (-74.9 ± 0.1 pA), pic 2 (-66.6 ± 0.1 pA), pic 1 (-59.4 ± 0.1 pA), pic 4 (-41.2 ± 0.02 pA) et pic 5 (-32.8 ± 0.5 pA). Les pics 1, 2 et 3 correspondent aux niveaux de conductance représentés par les niveaux respectifs sur le tracé A (**Figure 4.16**). Les pics 4 et 5 représentent deux niveaux de conductance inférieures (non représentés sur le tracé A). Les surfaces relatives sous les courbes gaussiennes (**Figure 4.16B**) par rapport à la surface totale de l'histogramme fournissent une estimation de la prépondérance de chaque état de conductance. On constate que les pores restent ouverts majoritairement (43 % du temps) au niveau de conductance représenté par le pic 4 alors que les niveaux de conductance 1, 2 et 3 sont moins fréquents (17 %, 9 % et 21 %, respectivement).

On outre, les enregistrements ont été souvent caractérisés par la présence de niveaux de faibles conductances. Par exemple, dans une membrane soumise à un potentiel de -40 mV (tracé A, **Figure 4.17**), les plus petits sauts de courant identifiés correspondent à une conductance de 23 pS (sauts de 1 à 2). Des sauts de courant correspondant à des conductances inférieures à celles-ci ont aussi été observés. À un potentiel de -60 mV, par exemple, les sauts de courant correspondant à la conductance de 18 pS ont été observés. Ces petits sauts de courant apparaissent souvent en tant que transitions vers des états de conductance inférieures (tracés A et B dans **Figure 4.17**, respectivement) mais parfois on les trouve aussi superposés à un niveau principal de conductance (saut de 2 à 3, tracé A).

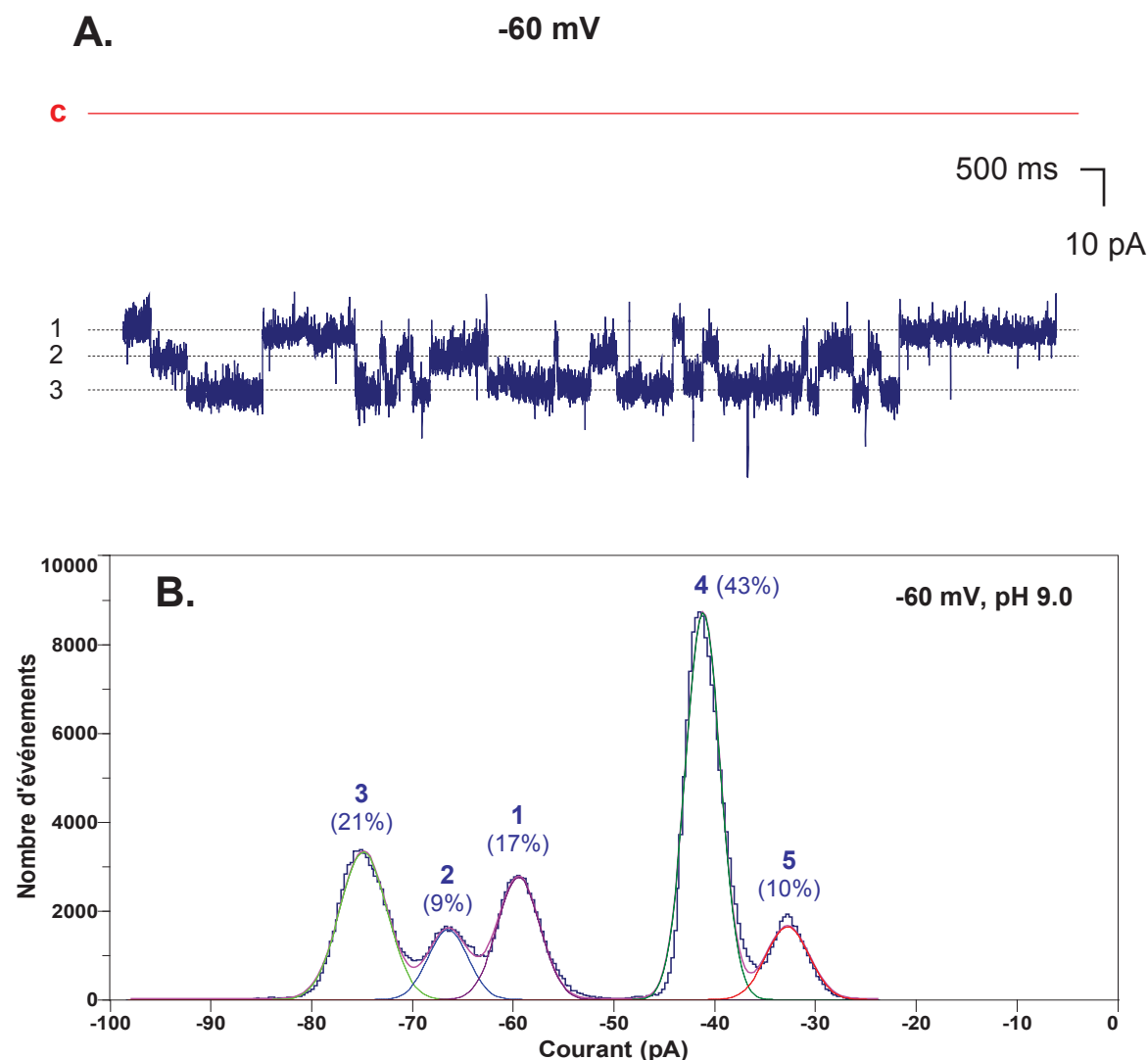


Figure 4.16. **A.** Enregistrement de courant à travers les pores formés par la Cry5Ba en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0 et à un potentiel de - 60 mV. Les conductances correspondantes sont de 258 pS (sauts de 1 à 3) et de 120 pS (niveau 2). **B.** Histogramme d'amplitude du courant pour le tracé A. La ligne continue mauve est obtenue par le lissage au moyen de cinq fonctions gaussiennes (les lignes discontinues). Les pics gaussiens sont centrés sur les valeurs suivantes : -74.9 ± 0.1 pA (pic 3), -66.6 ± 0.1 pA (pic 2), -59.4 ± 0.1 pA (pic 1), -41.2 ± 0.02 pA (pic 4) et -32.8 ± 0.5 pA (pic 5). Les valeurs en parenthèses indiquent les taux relatifs d'occupation de chaque niveau de conductance.

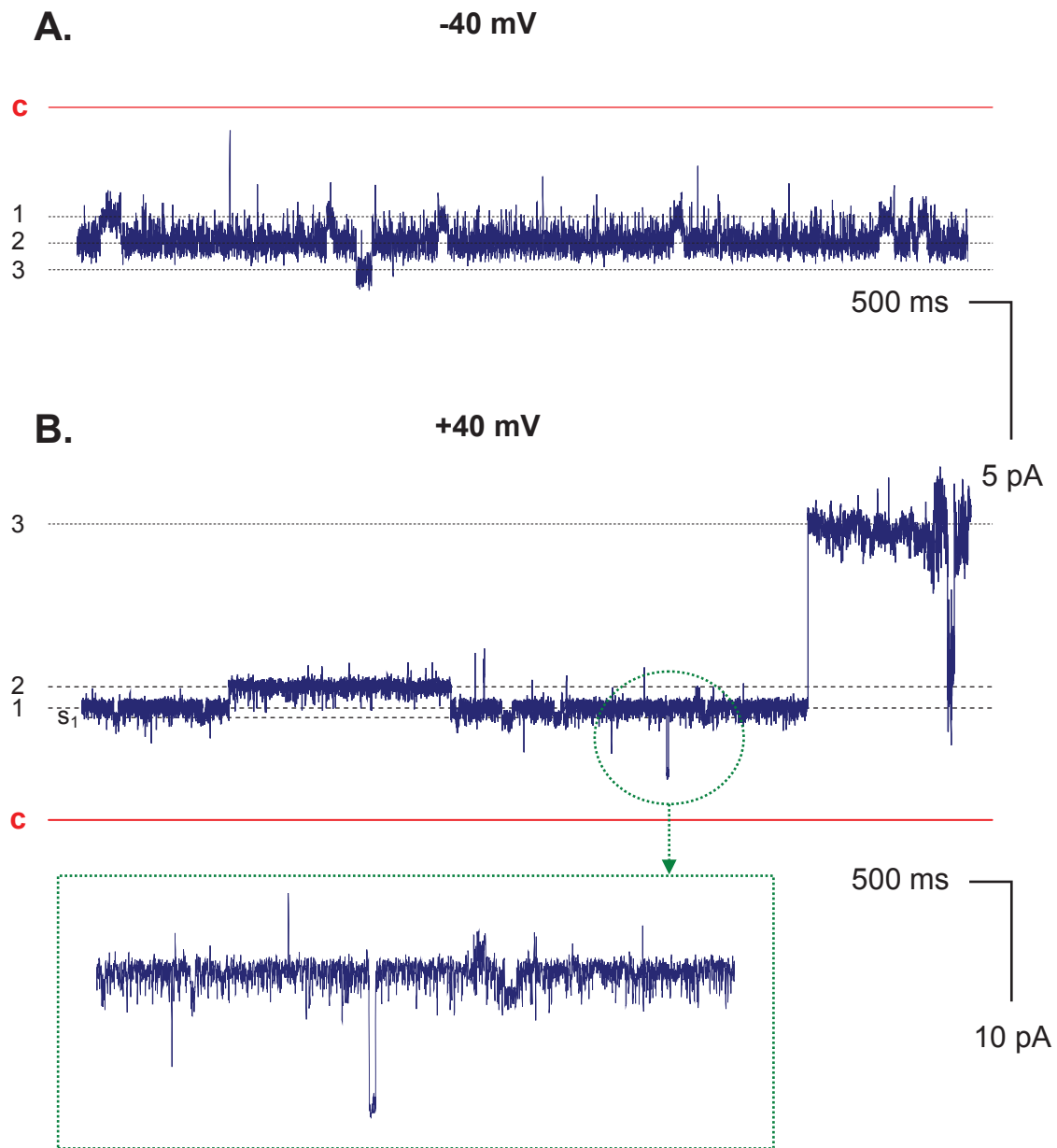


Figure 4.17. Enregistrements des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba dans des bicouches différentes en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. **A.** (-40 mV). Les conductances correspondantes sont de 124 pS (niveau 2) et 23 pS (sauts de 1 à 2 et 2 à 3). **B.** ($+40 \text{ mV}$). Les conductances correspondantes sont : 28 pS (sauts de 1 à S_1), 55 pS (sauts de 1 à 2) et 514 pS (saut de 1 à 3).

D'autres niveaux de conductance ont été observés dans une membrane qui a été soumise à un potentiel de +40 mV (tracé B, **Figure 4.17**). Ici, les petites transitions par rapport au niveau principal 1 correspondent à une conductance d'environ 28 pS, les sauts de courant entre les niveaux 1 et 2 correspondent à une conductance de 55 pS alors que le saut entre 1 et 3 correspond à une conductance de 514 pS. Plusieurs d'autres brefs états de sous-conductance, comme celui de 50 ms et correspondant à une conductance de 199 pS illustré dans l'agrandissement sous le tracé C, ont aussi été observés.

En plus, dans la même bicouche, mais pour différents potentiels imposés, plusieurs niveaux de conductance ont aussi été observés. À titre d'exemple, des tracés de courant obtenus dans la même bicouche soumise à +20 mV, +40 mV et +60 mV sont présentés à la **Figure 4.18**. Chaque tracé illustre une durée de 15 secondes provenant d'un enregistrement de courant d'environ 2 minutes. Ainsi, à + 20 mV (tracé A, **Figure 4.18**) on observe au moins cinq niveaux différents de conductance. Pour souci de clarté, seuls les niveaux 1 et 5 sont numérotés sur la figure. Les pores restent ouverts à peu près 80 % du temps au niveau 2 et plusieurs autres niveaux se superposent à ce niveau. La transition entre les niveaux 2 et 3, observée tout au début du tracé A, correspond à une conductance de 131 pS. Un saut de même amplitude (saut de 4 à 5) est superposé à celui correspondant à la conductance de 386 pS (saut de 2 à 4). Vers le milieu du tracé A, les transitions de courant entre les niveaux 1 et 2 correspondent aussi à une conductance de 131 pS durant cet enregistrement. Ainsi, le grand niveau de conductance superposé au niveau 4 correspond à une conductance de 551 pS pendant environ 17 ms. L'analyse plus détaillée de ces transitions a révélé que certaines

d'entre elles résultent de la superposition d'au moins deux niveaux différents de conductances inférieures.

Pour un potentiel de + 40 mV (tracé B, **Figure 4.18**), des sauts de courant correspondant à au moins cinq valeurs différentes de conductance ont été identifiées dans la même membrane : 138 pS (sauts de 1 à 2), 300 pS (saut de 3 à 4), 425 pS (sauts de 1 à 3), 725 pS (sauts de 1 à 4) et 896 pS (sauts de 1 à 5). Le grand saut de courant correspondant à la grande conductance de 725 pS (sauts de 1 à 4, à la fin du tracé C) résulte de la superposition simultanée de sauts de courant correspondant à des conductances de 425 pS et 300 pS. Les sauts de courant entre les niveaux 1 et 5 correspondant à 896 pS sont les plus fréquents. Cependant, des sauts de courant correspondant à des conductances supérieures à cette valeur, ont aussi été observés dans cet enregistrement. À un potentiel de + 60 mV (tracé C, **Figure 4.18**), les trois niveaux de conductance les plus fréquemment observés correspondent à des conductances de 158 pS (sauts de 1 à 2), 428 pS (saut de 2 à 3) et 122 pS (sauts de 3 à 4). D'autres niveaux de conductance (correspondant à 315 et 558 pS) ont aussi observés (non présentés sur le tracé C).

Par ailleurs, en réponse au même potentiel imposé dans deux bicouches différentes, plusieurs sauts de courant correspondant à des conductances différentes ont été identifiés. L'activité des pores a aussi été variable d'une bicouche à l'autre (tracés A et B, **Figure 4.19**). Les tracés de courant A et B durent chacun deux minutes et ont été obtenus sur deux bicouches différentes à un potentiel imposé de - 20 mV. Sur le tracé A, les pores restent essentiellement ouverts au niveau 2 de conductance qui correspond à 187 pS (93 % de temps). Seules deux fermetures correspondant à une conductance de 127 pS (sauts de 1 à 2) et

d'environ 5 secondes ont été observées. En revanche, sur le tracé B, les transitions sont beaucoup plus fréquentes. Les courants fluctuent rapidement entre plusieurs états de conductance : saut de 4 à 5 (295 pS), saut de 5 à 6 (230 pS), saut de 6 à 7 (280 pS) et saut 6 à 8 (449 pS). Des transitions correspondant à des conductances de 115 pS et 140 pS, ont été observées en tant que sous-états pour les conductances de 295 et 280 pS, respectivement.

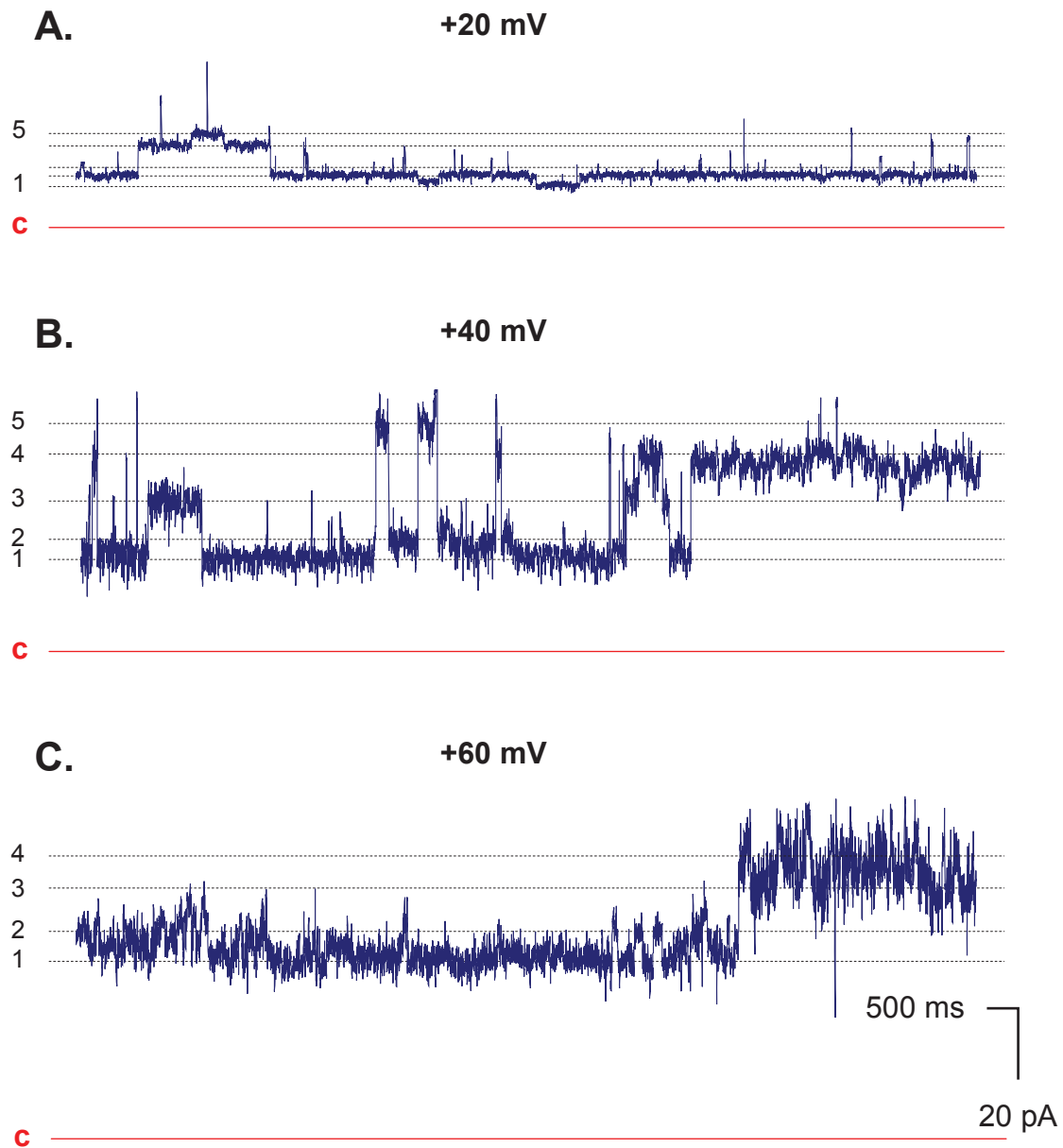


Figure 4.18. Tracés des courants unitaires à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels appliqués à la même bicouche en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. **A.** (+20 mV). Les conductances correspondantes sont : 131 pS (sauts de 1 à 2, de 2 à 3 et de 4 à 5) et 386 pS (sauts de 2 à 4). **B.** (+40 mV). Les conductances correspondantes sont : 138 pS (sauts de 1 à 2), 425 pS (sauts de 1 à 3), 725 pS (sauts de 1 à 4) et 896 pS (sauts de 1 à 5). **C.** (+60 mV). Les conductances correspondantes sont : 148 pS (sauts de 1 à 2), 492 pS (saut de 2 à 3) et 122 pS (sauts de 3 à 4).

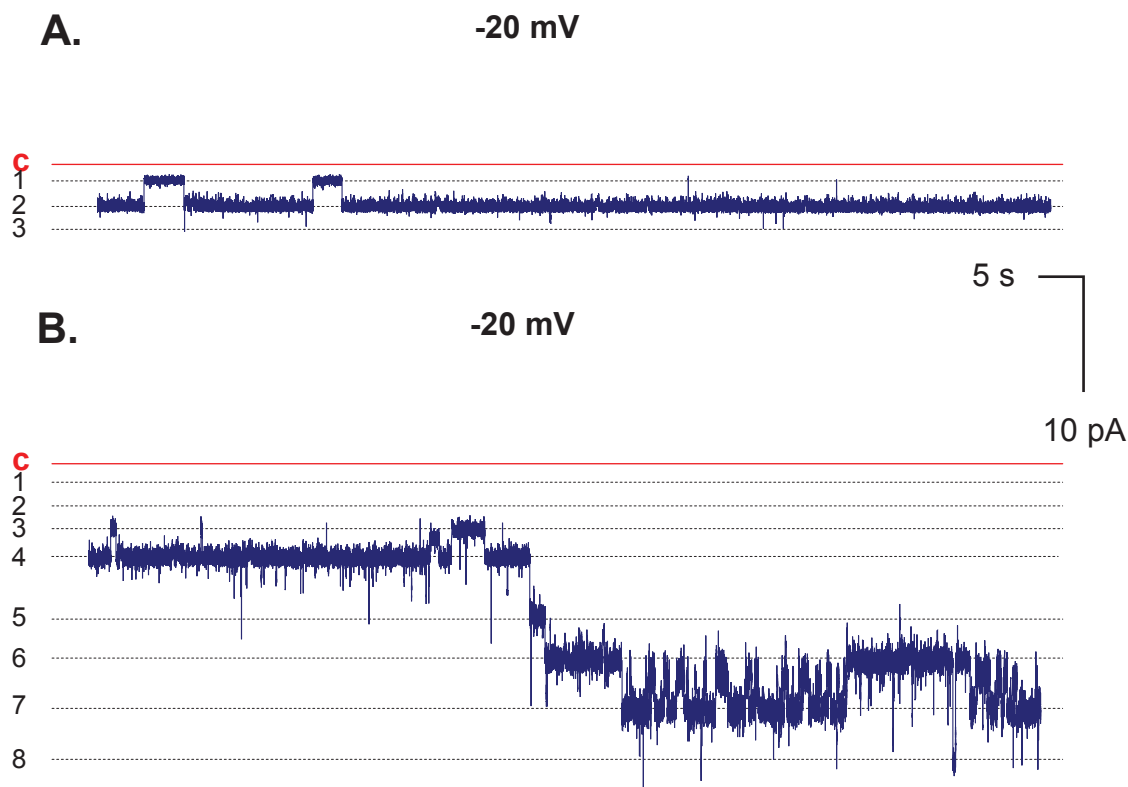


Figure 4.19. Courants unitaires des pores formés par la Cry5Ba enregistrés dans deux bicouches différentes soumises à un potentiel de - 20 mV en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. **A.** (-20 mV). Les conductances correspondantes sont de 187 pS et 127 pS. **B.** (-20 mV). Tracé obtenu pour une bicouche différente de celle de l’expérience illustrée en A. Les conductances correspondantes sont : 295 pS (saut de 4 à 5), 230 pS (saut de 5 à 6), 280 pS (saut de 6 à 7) et 449 pS (saut de 6 à 8). La barre d’échelle est la même pour les deux tracés.

Cependant, des sauts de courant représentant la même conductance ont pu être identifiés pour tous les potentiels imposés à la même bicouche comme illustrés dans les tracés présentés à la **Figure 4.20**. Une conductance principale correspondant à des sauts de courant que l’on observe sur ces tracés pour tous les potentiels appliqués est présentée à la **Figure 4-21**.

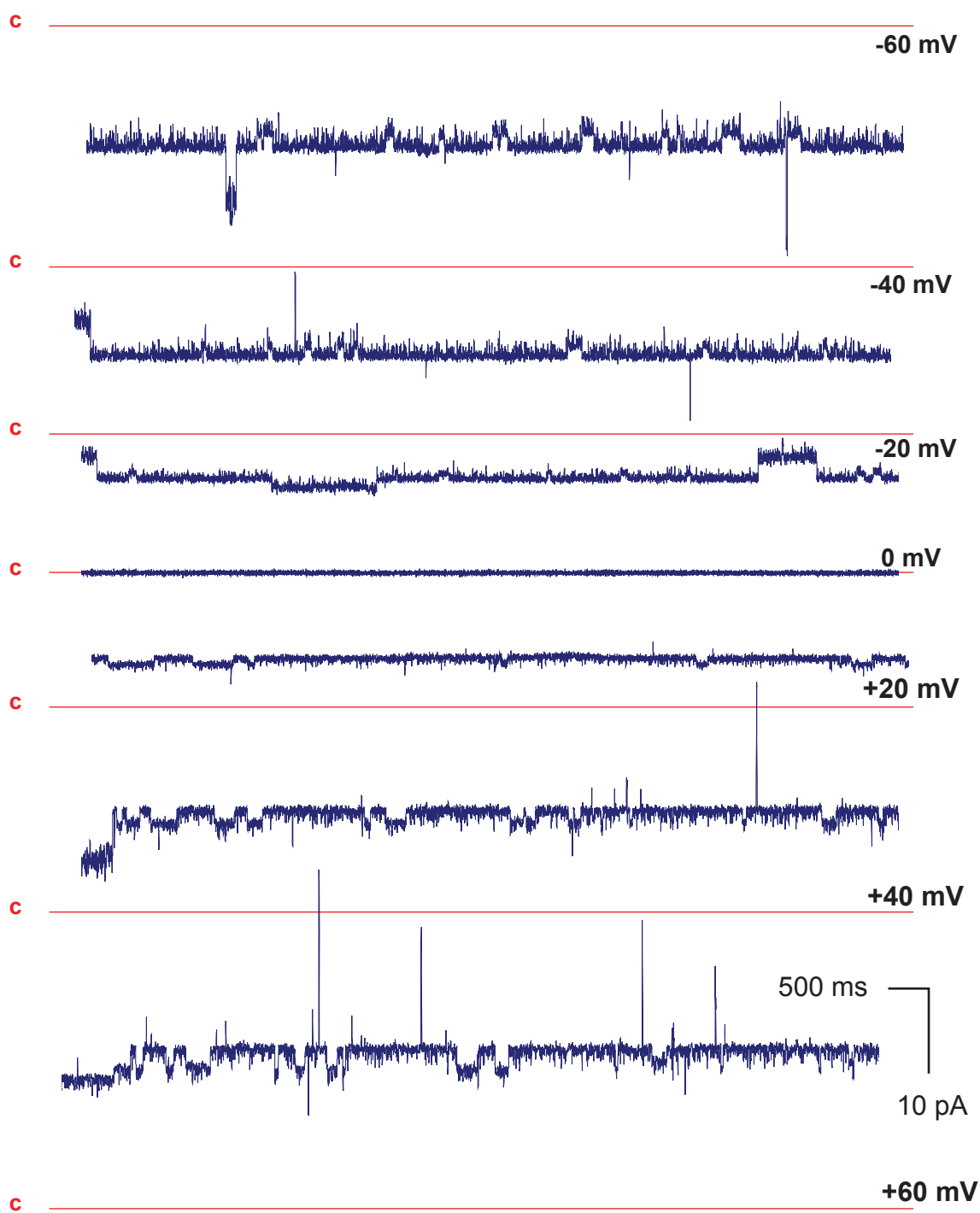


Figure 4.20. Tracés des courants ioniques à travers les pores formés par la Cry5Ba pour différents potentiels imposés à la même bicouche en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. La barre d'échelle est la même pour tous les tracés.

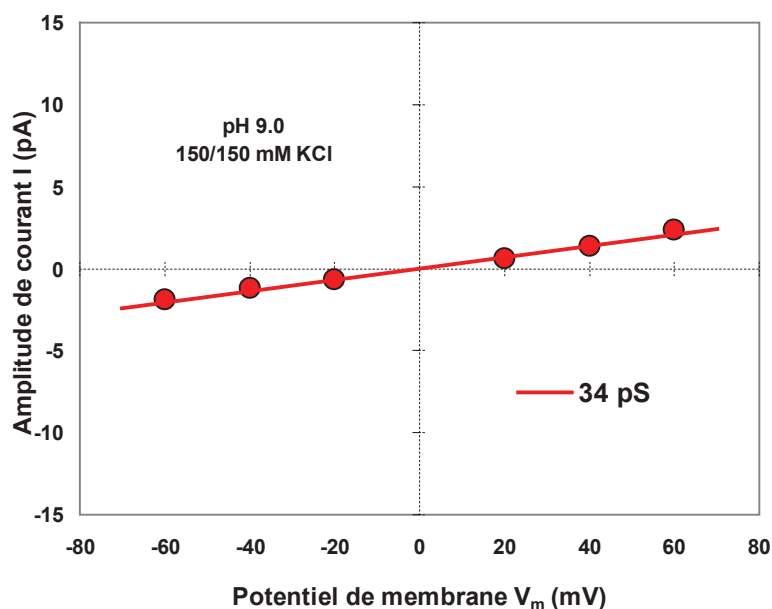


Figure 4-21. Relation courant-potentiel (I-V) pour les sauts de courant correspondant à la conductance principale que l'on observe sur les tracés présentés à la **Figure 4.20** pour tous les potentiels appliqués sur la même bicouche, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. Les points représentent l'amplitude des sauts de courant mesurés expérimentalement sur ces tracés. La pente de la droite de régression linéaire tracée sur les points expérimentaux correspond à la valeur de la conductance indiquée sur le graphique.

Les plus petits sauts de courant qui ont été observés dans l'ensemble des expériences réalisées en conditions symétriques à pH 9.0 correspondent à des conductances variant de 18 à 26 pS. Ils sont principalement observés pour des potentiels supérieurs à ± 20 mV. D'autre part, des sauts de courant correspondant à des grandes conductances de l'ordre de 500 pS ont souvent été observés pour différentes valeurs de potentiels et dans différentes expériences. Des sauts de courant correspondant à des conductances supérieures à 500 pS ont aussi été

observés mais essentiellement pour des potentiels supérieurs à ± 20 mV. Les grands sauts de courant correspondant à des grandes conductances apparaissent parfois de façon indépendante, mais d'autres fois se manifestent aussi comme des états de sous-conductance.

Une dernière caractéristique des enregistrements du courant en conditions symétriques à pH 9.0 était que la fermeture complète simultanée de tous les pores (état **c**) de la Cry5Ba a rarement été observée.

4.4.2 Relation courant - potentiel (I-V)

L'analyse de 8 expériences (sur un total de 20) a permis d'identifier les sauts de courant les plus fréquents et de tracer les relations courant-potentiel (I-V). Ces dernières sont illustrées à la **Figure 4.22**. Les valeurs des conductances correspondant à des sauts de courant les plus fréquemment observés s'étalent de 36 ± 2 pS à 329 ± 2 pS. Les sauts de courant correspondant à des petites conductances de 18 à 26 pS ainsi que ceux de celles supérieures à 500 pS sont apparus moins souvent (cinq expériences). À des potentiels imposés de ± 60 mV, des grands sauts de courant correspondant à des conductances aussi grandes que 928 pS ont été occasionnellement mesurés. Les grandes conductances observées sont approximativement des multiples entiers de la plus petite conductance de 18 pS.

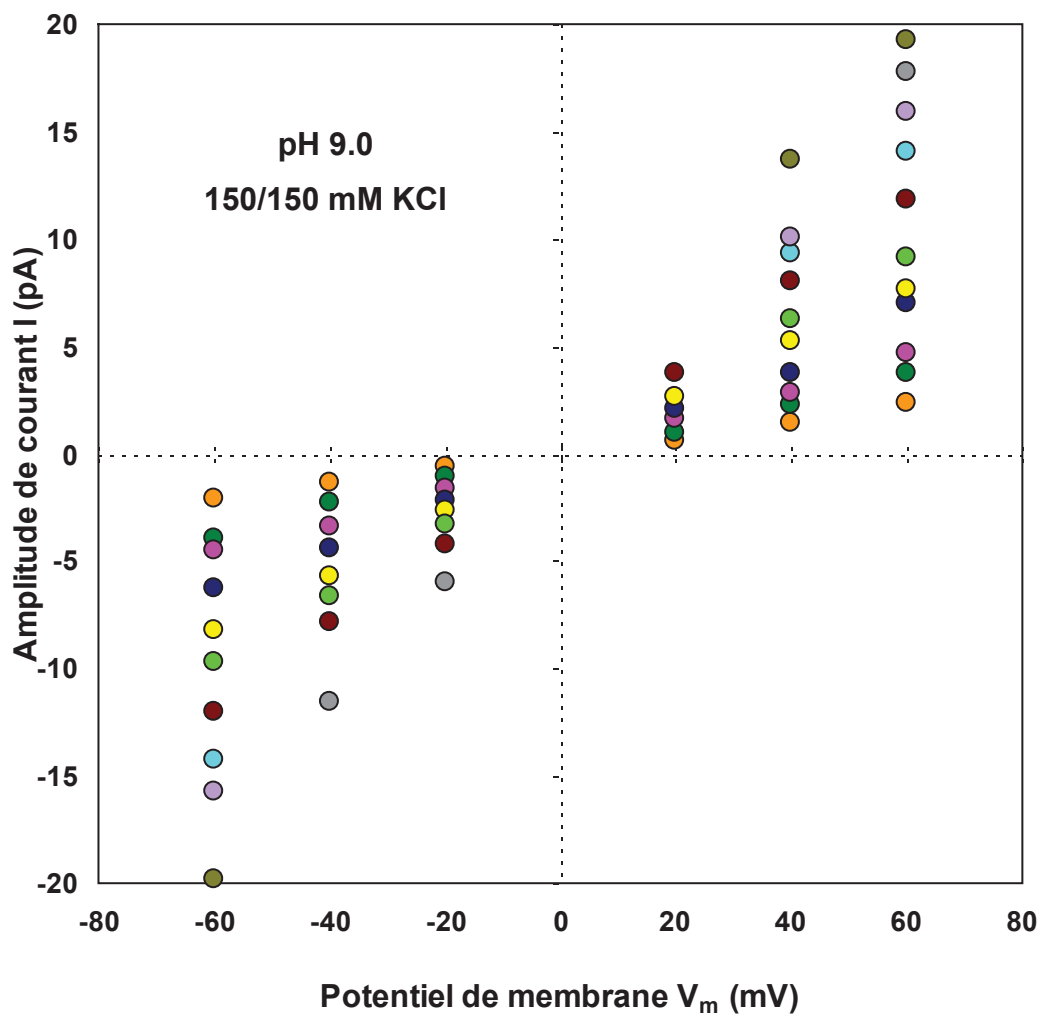


Figure 4.22. Relations courant-potentiel (I-V) des pores formés par la Cry5Ba en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. Les points représentent l'amplitude moyenne du courant obtenue pour au moins un potentiel imposé dans les différentes expériences. Les barres d'erreur sont plus petites que la taille de symboles représentant les points expérimentaux.

Les conductances correspondant à des sauts de courant les plus fréquemment observés expérimentalement sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 4.2. Les conductances correspondant à des sauts de courant les plus souvent observées expérimentalement pour les pores formés par la Cry5Ba en conditions de solutions ioniques symétriques de 150 mM KCl à pH 9.0. Le nombre d'expériences pour lesquelles un niveau de conductance a été observé pour au moins deux potentiels différents imposés à la même bicouche est indiqué par la lettre N. Ces résultats proviennent de 8 expériences analysables, sur un total de 20 expériences effectuées dans ces conditions.

Conductance \pm E.S.M. (pS)	36 ± 2	62 ± 2	77 ± 2	108 ± 1	133 ± 2	158 ± 1
N	6	5	3	5	6	5
Conductance \pm E.S.M. (pS)	198 ± 1	235 ± 1	261 ± 3	295 ± 2	329 ± 4	
N	4	2	2	2	2	

N : nombre d'expériences ; E.S.M. : l'erreur standard de la moyenne.

En résumé, d'une part, la diversité des conductances suggère que les pores formés par la Cry5Ba pourraient être des oligomères constitués d'un nombre différent de pores unitaires de conductances identiques ou semblables. D'autre part, il est aussi possible que des structures formées d'agrégats de tailles différentes, mais constitués de plusieurs pores identiques s'activant de façon coopérative, se trouvent dans les bicouches. Ces possibilités sont discutées de façon plus détaillée au CHAPITRE 5.

4.4.3 Cinétique

4.4.3.1 Comportement cinétique

La cinétique des pores formés par la Cry5Ba était variable, non seulement sur la même bicouche soumise à des potentiels imposés différents (**Figure 4.18**) mais aussi dans des bicouches différentes soumises au même potentiel (**Figure 4.19**). En général, trois types de comportements ont été rencontrés.

Premièrement, les enregistrements ont fréquemment été caractérisés par une cinétique lente avec des périodes d'ouverture relativement longues à un niveau principal de conductance accompagnés par des ouvertures ou des fermetures à des niveaux de conductance supérieurs ou inférieurs. Ce comportement a été observé pour différentes valeurs de potentiel imposé. Dans l'exemple illustré sur le tracé A (**Figure 4.23**) pour un potentiel de +20 mV les pores restent ouverts 96 % du temps (24 secondes sur 25) au niveau principal de conductance. Vers la fin du tracé, le saut entre le niveau principal et le niveau de conductance inférieur dure environ 400 ms, alors que les deux petites ouvertures correspondant à des sauts de niveau principal à un niveau de conductance supérieure durent environ 180 ms. Au moins quatre autres ouvertures de même amplitude ont été observées sur la totalité de l'enregistrement (non illustrées) avec des durées pouvant aller jusqu'à un maximum de 670 ms. Une cinétique similaire a aussi été observée à un potentiel de -20 mV (tracé A, **Figure 4.19**).

Deuxièmement, les transitions de courant survenant du niveau principal de conductance à d'autres niveaux (habituellement de conductances inférieures) ont souvent été plus rapides (tracés B, **Figure 4.19** et **Figure 4.23**). On constate ainsi un total de 32

transitions de fermetures vers le bas sur l'enregistrement de 25 secondes du tracé B (**Figure 4.23**). De telles fluctuations dans la cinétique des pores ont été observées pour différents potentiels imposés.

Troisièmement, de longues périodes d'ouverture ou de fermeture à un niveau principal de conductance sont souvent interrompues par des bouffées d'activité constituées de longues ouvertures et de transitions rapides des courants (tracé C, **Figure 4.23**).

Par ailleurs, la cinétique des pores était parfois plus complexe avec des sauts de courant entre les différents niveaux correspondant à des états de conductance moins bien définis. Les fermetures complètes (0 pA) ont été rarement observées (2 expériences sur 8).

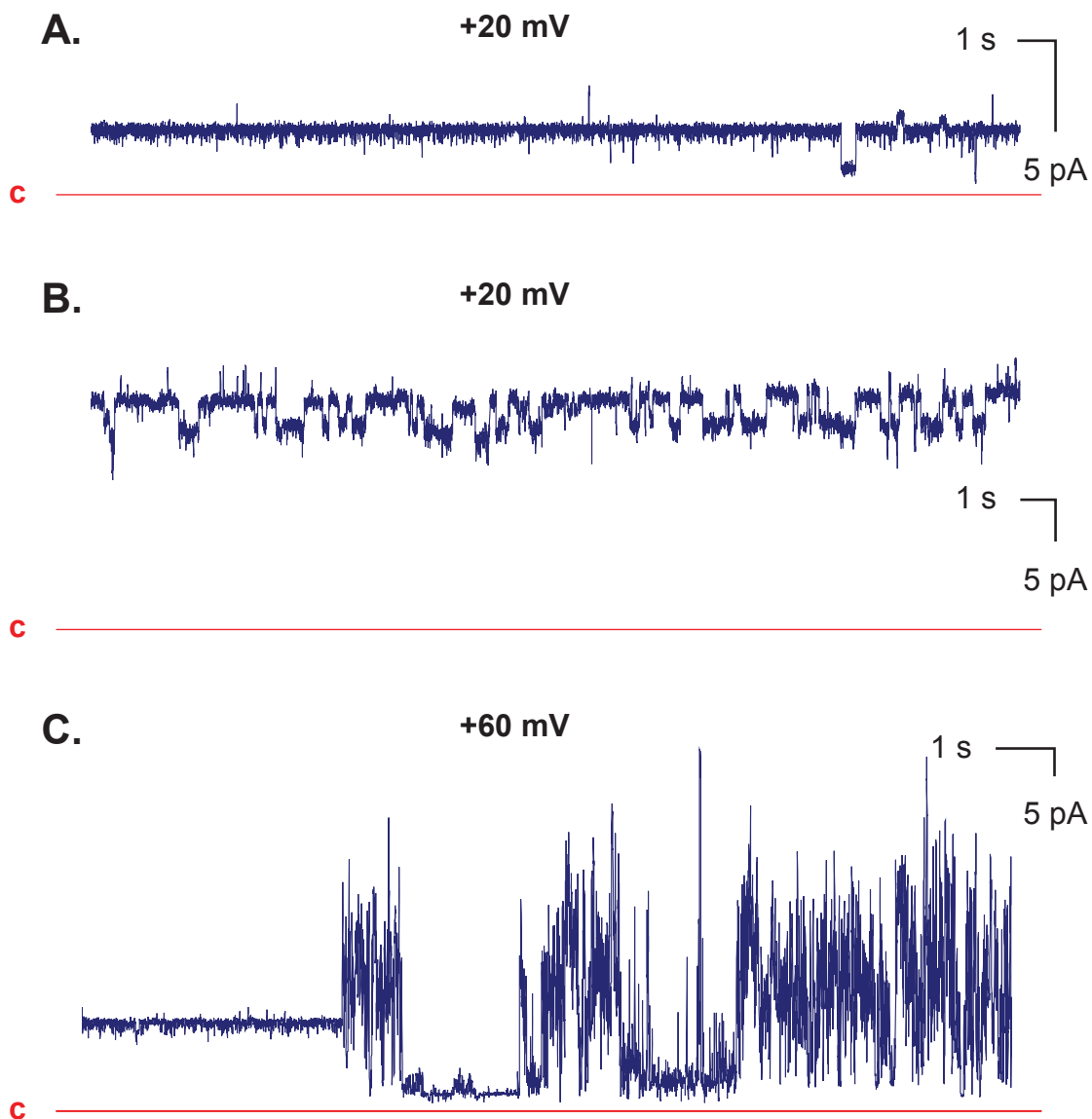


Figure 4.23. Tracés des courants unitaires illustrant le comportement cinétique des pores formés par la Cry5Ba en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. **A.** (+20 mV). Tracé de 25 s illustrant les transitions lentes du courant. Les pores passent environ 96 % du temps dans l'état de conductance principale. **B.** (+20 mV). Tracé de 25 s enregistré dans une membrane différente de celle illustrée en A et montrant les transitions rapides du courant. On constate 32 fermetures se produisant pendant la totalité de l'enregistrement. **C.** (+60 mV). Tracé de 15 s illustrant les bouffées d'activité des pores.

4.4.3.2 Analyse cinétique

Une analyse cinétique a été effectuée sur l'enregistrement dont le courant est illustré sur le tracé B à la figure **Figure 4.23** et où les sauts de courant observés correspondent à la conductance principale de 149 pS. Les sauts de courant correspondant à des conductances autres que cette dernière ont été très brefs et n'ont pas été pris en compte dans l'estimation des temps moyens d'ouverture et fermeture. Les histogrammes de temps d'ouverture et de fermeture sont présentés à la **Figure 4.24**. L'histogramme des temps d'ouverture (**Figure 4.24A**) a été ajusté par la somme de deux fonctions exponentielles qui s'adaptent bien aux ouvertures de courtes et de longues durées. La constante du temps de la composante rapide (ligne rouge en pointillés) correspond à un temps ouvert moyen $\tau_{or} = 22 \pm 16$ ms, alors que celle de la composante lente (ligne bleue en pointillés) est $\tau_{ol} = 540 \pm 86$ ms. Le temps moyen de séjour dans l'état ouvert est de 580 ms. La probabilité d'ouverture p_o de ce pore est de 0.63. L'histogramme des temps de fermeture pour le même pore de conductance de 149 pS (**Figure 4.24B**) a été bien ajusté par une seule fonction exponentielle (ligne verte superposée sur l'histogramme). La constante de temps de l'exponentielle correspond à un temps fermé moyen $\tau_f = 262 \pm 21$ ms.

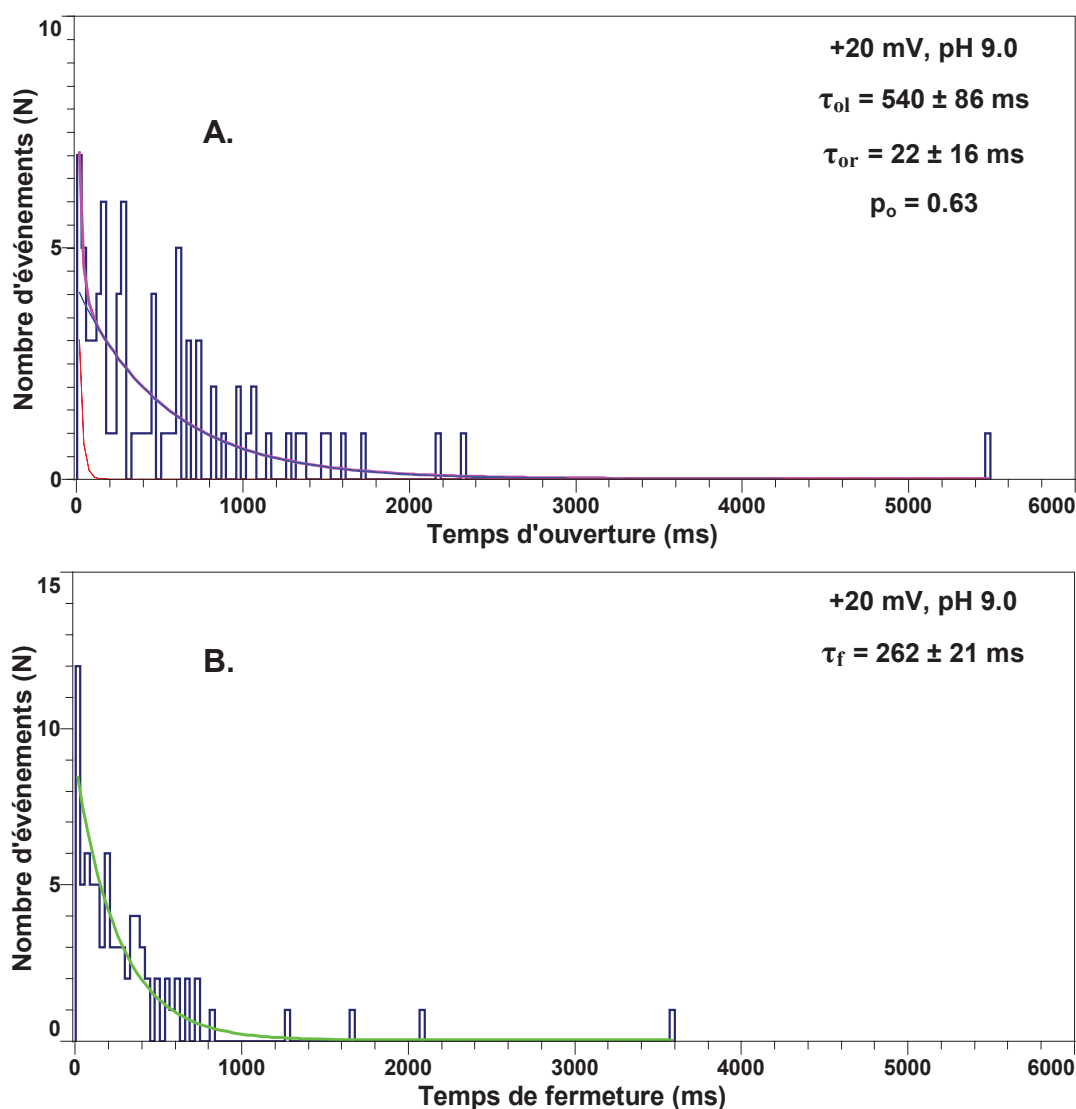


Figure 4.24. Histogrammes des temps de séjour pour le pore de conductance de 149 pS dont le courant est illustré sur le tracé B à la **Figure 4.23** obtenu à -20 mV, en conditions symétriques de 150 mM de KCl à pH 9.0. **A.** L'histogramme des temps d'ouverture a été ajusté par la somme de deux exponentielles décroissantes (ligne continue magenta) avec les constantes de temps $\tau_{ol} = 540 \pm 86$ ms et $\tau_{or} = 22 \pm 16$ ms pour la composante lente et rapide, respectivement. Le temps moyen de séjour dans l'état ouvert est de 580 ms. **B.** La courbe (ligne continue verte) ajustée à l'histogramme des temps de fermeture a été ajustée par à une simple décroissance exponentielle avec une constante de temps $\tau_f = 262 \pm 21$ ms. Un seuil de résolution de 10 ms a été imposé pour les deux histogrammes et la largeur de barres est de 30 ms.

4.4.4 Sélectivité ionique

La sélectivité ionique des pores de Cry5Ba à pH 9.0 a été déterminée par des expériences effectuées en conditions ioniques asymétriques de KCl de 450/150 mM (*cis/trans*). Des tracés de courants ioniques enregistrés dans ces conditions sont illustrés à la **Figure 4.25**. Des niveaux de conductance multiples ont été observés à chaque potentiel imposé. Comme dans le cas de l'analyse de la sélectivité ionique à pH acide, les points représentant les sauts de courant correspondant aux mêmes niveaux de conductance ne peuvent pas être reliés de façon précise et sans ambiguïté. Les potentiels d'inversion se trouvent dans la région autour -20 à 0 mV indiquée par le double-flèche en couleur ambre à la **Figure 4.26**, sur laquelle les points de même couleur représentent les valeurs des courants unitaires obtenues dans la même bicouche. Le potentiel d'inversion se rapproche alors du potentiel de Nernst de -27.8 mV pour le potassium. Les pores de Cry5Ba sont donc plus sélectifs pour le potassium que pour le chlore. Les rapports de perméabilité P_{K^+}/P_{Cl^-} pour cette région de potentiels d'inversion sont inférieurs à 7.1 indiquant une sélectivité cationique faible des pores formés par cette toxine.

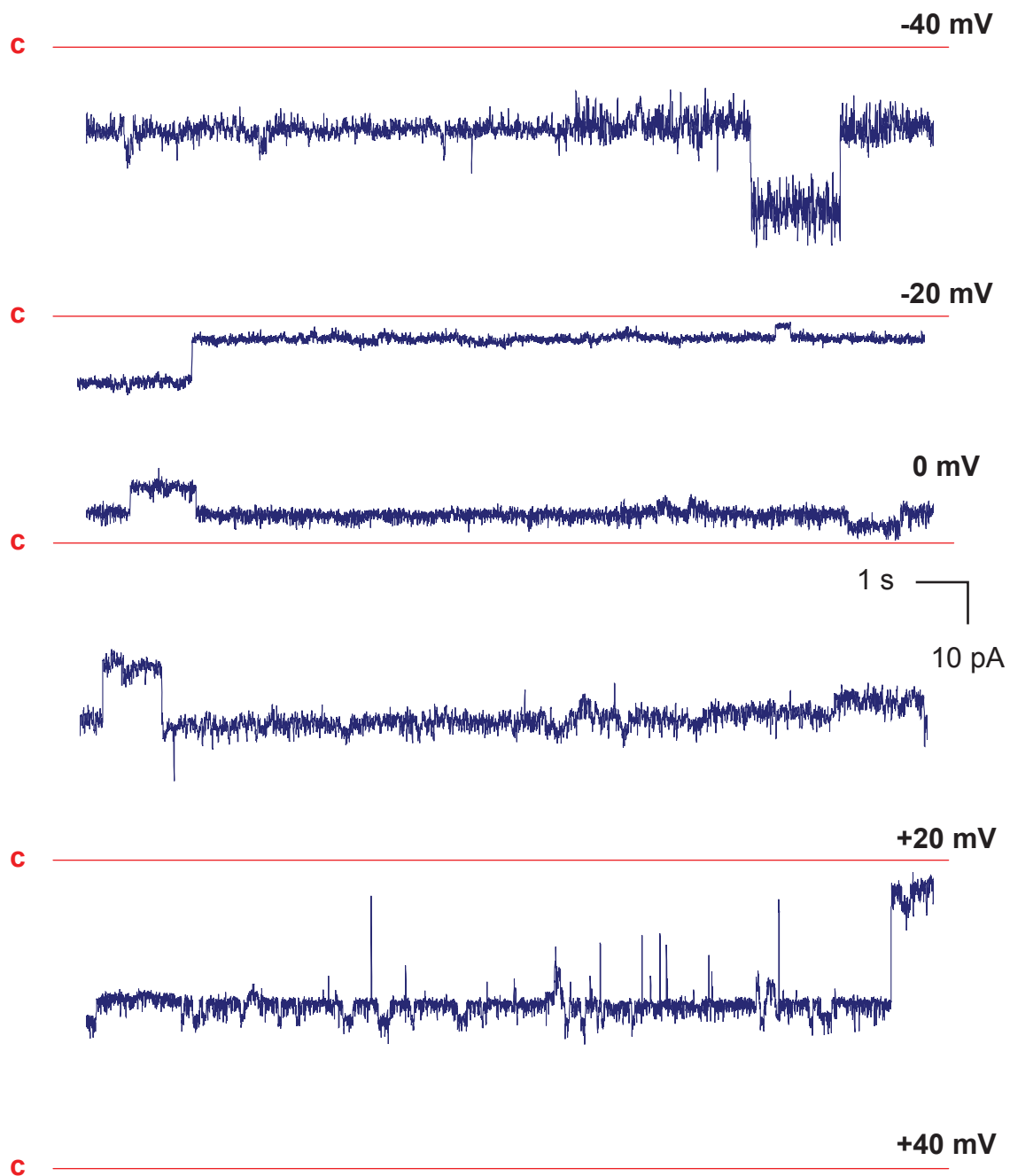


Figure 4.25. Tracés de courants ioniques obtenus à travers les pores formés par la Cry5Ba sur la même bicouche en conditions asymétriques de 450/150 mM de KCl à pH 9.0, illustrant les sauts de courant observés pour différents potentiels imposés à la même bicouche. La barre d'échelle est la même pour tous les tracés.

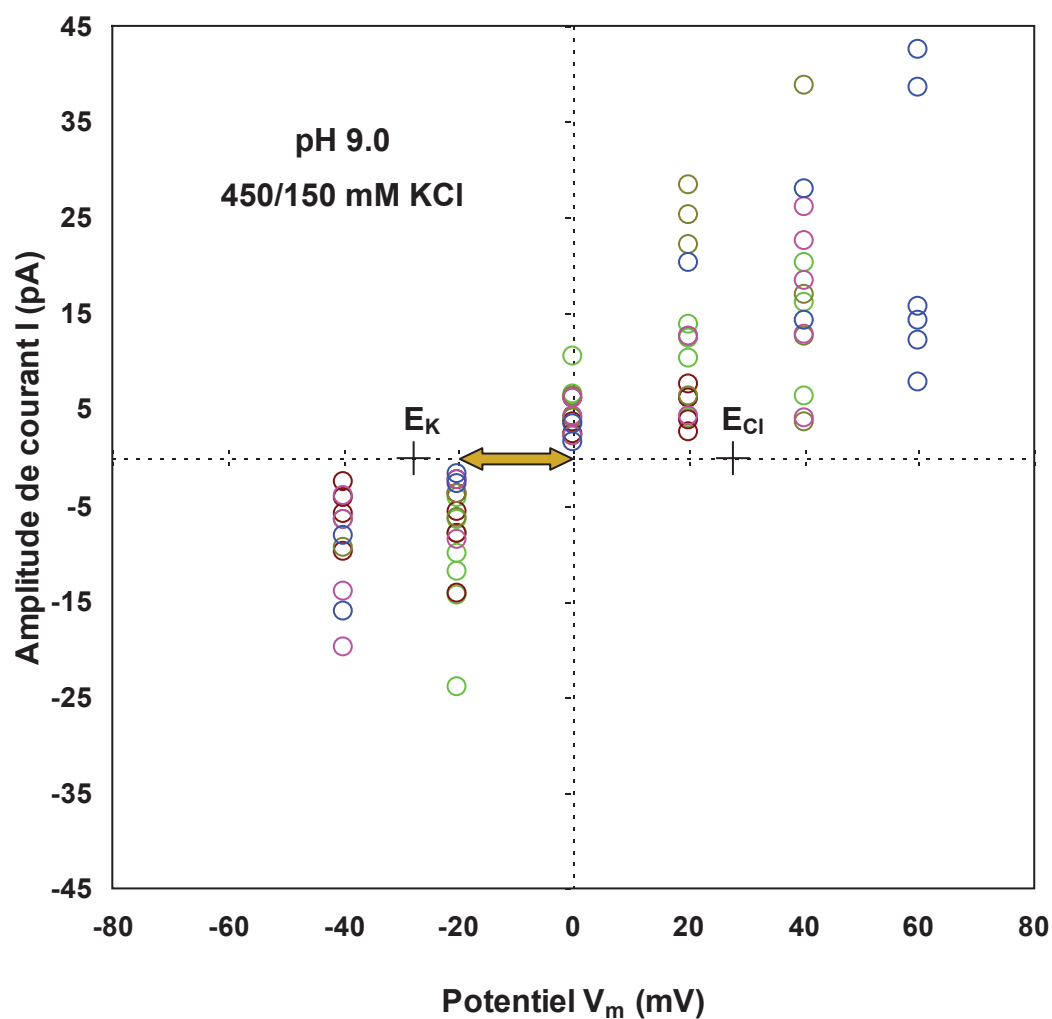


Figure 4.26. Potentiels d'inversion des pores formés par la Cry5Ba en conditions asymétriques de KCl de 450/150 mM (*cis/trans*) à pH 9.0. Les points d'une même couleur proviennent de l'analyse de la même membrane. Les potentiels d'inversion se situent dans la région indiquée par le double-flèche de couleur ambre entre -20 et 0 mV. E_K et E_{Cl} indiquent les potentiels d'équilibre de Nernst pour K^+ et Cl^- .

CHAPITRE 5. DISCUSSION

Il a été démontré par plusieurs études que certaines toxines Cry sont aptes à former de pores dans les BLP sans récepteurs ou les vésicules phospholipidiques sans récepteurs (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; English *et al.*, 1994; Von Tersch *et al.*, 1994; Grochulski *et al.*, 1995; Racapé *et al.*, 1997; Peyronnet *et al.*, 2000a; Peyronnet *et al.*, 2001; Vié *et al.*, 2001; Peyronnet *et al.*, 2002; Puntheeranurak *et al.*, 2004; Brunet *et al.*, 2010; Rodriguez-Almazán *et al.*, 2012).

La présente étude a été entreprise dans le but principal de valider, dans un premier temps, l'hypothèse selon laquelle la toxine nématocide Cry5Ba, en tant qu'une toxine Cry du *Bt*, pourrait elle aussi former des pores dans les BLP, ainsi que caractériser les propriétés électrophysiologiques des pores formés.

5.1 Formation de pores et effet du pH

Les expériences réalisées dans cette étude ont permis de confirmer que la toxine nématocide Cry5Ba forme des pores dans les BLM sans récepteurs, et ceci, dans des conditions acides ou alcalines des solutions aqueuses utilisées de part et d'autre de la bicouche. Toutefois, il a été remarqué que le pH acide joue le rôle d'un élément facilitant la formation de pores. Ainsi, à pH 6.0 le temps d'insertion de la toxine sur la bicouche, tel qu'indiqué par l'apparition de l'activité des sauts de courant, varie de 5 à 15 minutes. Par

contre, quand des solutions aqueuses de KCl ayant la même concentration mais à pH 9.0 ont été utilisées, le temps d'insertion s'étend de 5 à 35 minutes. En outre, à pH 6.0 le taux d'insertion des pores dans les bicouches était de 75 % des expériences effectuées, alors que cette valeur était d'environ 50 % à pH 9.0. D'autant plus qu'à pH 6.0, l'apparition de l'activité électrique a souvent été observée pour des concentrations minimales de toxine (5 µg/mL), alors que des concentrations plus élevées ont souvent été nécessaires à pH 9.0. Cette valeur minimale est en bonne corrélation avec les concentrations létales *in vitro* variant de 5 µg/mL à 12.6 µg/mL (LC₅₀) de la Cry5Ba (Marroquin *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003; Cappello *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). Le pH acide favorise donc l'effet toxique de la Cry5Ba, ce qui est en accord avec son effet *in vivo* chez les nématodes, dont le pH intestinal est d'environ 6 (Laurent *et al.*, 2001). Comme mentionné précédemment, le pH joue un rôle clé dans la cascade toxique des protéines Cry au niveau de la solubilisation des protoxines. Par exemple, les conditions de pH utilisées pour solubiliser et activer la protoxine Cry4B affectent la gamme de conductances des pores formés dans les BLP par la toxine activée, ainsi que leur activité (Puntheeranurak *et al.*, 2004). De plus, chez des espèces de nématodes parasites du bétail, l'efficacité toxique d'une suspension spore-cristal d'un *Bt* contenant les toxines Cry5A, Cry5Ba et Cry21A diminue jusqu'à l'inactivité complète, quand le pH de la suspension est réduit à 3.0 ou à 1.0 (Kotze *et al.*, 2005). Ceci pourrait être dû au manque de la solubilisation du cristal ou de l'activation de la protoxine à ces valeurs extrêmes du pH. Or, dans la présente étude, une forme activée de la Cry5Ba a été utilisée dans toutes les expériences. L'effet favorisant du pH acide dans la formation des pores pourrait alors être expliqué par un changement (par titrage) qu'il entraîne dans la charge de certaines des chaînes latérales des acides aminés qui constituent la protéine. Par conséquent, la charge nette de la

protéine, son caractère amphiphile, ainsi que son repliement changeraient de façon à ce que les interactions protéine-bicouche favorisent d'avantage l'insertion de la protéine. D'autre part, le titrage des charges à la surface de la bicouche phospholipidique pourrait lui aussi résulter en une modification de l'affinité de la toxine pour la bicouche. Ceci a d'ailleurs été démontré pour les toxines Cry1C (Butko *et al.*, 1994), Cry1Ac et Cry1Ca (Fortier *et al.*, 2005). L'effet du pH dans la formation de pores et de leurs propriétés a aussi été démontré pour d'autres toxines Cry. Par exemple, Tran *et al.* (2001) ont démontré que pour la Cry1C, le taux de formation de pores dans les VMBB de l'intestin moyen des larves de *M. sexta* diminue de façon importante lorsque le pH a été diminué de 10.5 à 6.5. En revanche, pour la Cry1Ac, la perméabilité des membranes reste élevée pour la gamme de pH entre 6.5 et 10.5. De plus, une autre étude a mis en évidence que pour la toxine Cry9Ca, l'augmentation du pH de 6.5 à 10.5 entraîne la diminution du temps d'insertion et du taux de formation de pores (Brunet *et al.*, 2010). Des résultats concordant avec les toxicités *in vivo* de ces toxines envers les larves de *M. sexta* ont été rapportés par ces deux dernières études mentionnées ci-dessus.

Chez les larves de lépidoptère, le mode d'action des toxines Cry par formation de pores dans la membrane apicale de leurs cellules intestinales en colonne implique l'interruption à la fois de l'équilibre ionique et du pH de ces cellules ce qui aboutit au gonflement des cellules et leur lyse osmotique colloïdale (Knowles et Dow, 1993; Gringorten, 2001). On pourrait présumer que de façon analogique le mode d'action éventuel des toxines Cry nématocides, y compris la Cry5Ba, implique la lyse osmotique colloïdale des cellules intestinales de nématodes. Contrairement aux lépidoptères les mécanismes de transport membranaires et de pH intestinal du nématode sont pratiquement inconnus. Une étude

détaillée de ces mécanismes dans *C. elegans* devrait permettre de mieux comprendre le mode d'action de Cry5Ba sur les organismes ciblés par cette toxine.

5.2 Dose active et dose létale

Pour certaines toxines Cry insecticides, les doses nécessaires pour observer la formation des pores dans les BPL sans récepteurs sont de 100 à 1000 fois supérieure à leur concentrations *in vivo* (Peyronnet *et al.*, 2001). Néanmoins, pour d'autres toxines comme la Cry1C, la perméation et les propriétés cinétiques des pores formés dans les BLP sans récepteurs et dans les membranes des cellules Sf9 sont semblables sous des conditions comparables de pH et pour les mêmes doses de toxine (Schwartz *et al.*, 1991). Cependant, pour la Cry5Ba ces concentrations sont de 5 à 10 µg/mL et comparables avec la dose létale LC₅₀ de 12.6 µg/mL, *in vivo* (Marroquin *et al.*, 2000). La présence des récepteurs dans la membrane réduit significativement la concentration de toxine nécessaire pour la formation de pores. Ainsi, Peyronnet *et al.* (2001) ont incorporé des VMBB de *L. dispar* dans les BLP et ils ont observé que dans ces conditions l'activité des pores a été induite pour des concentrations de Cry1Aa de 1.1 à 2.15 nM (des doses comparables avec celles létales *in vivo*) alors que dans les expériences en BLP sans récepteurs les doses sont de 100 à 500 nM. Alors qu'on croit qu'en général les récepteurs des toxines Cry soient impliqués dans la reconnaissance et la liaison de la toxine ainsi que dans son concentration à la surface de la bicouche (Pigott et Ellar, 2007), il est possible que la dernière étape ne soit pas spécifique pour toutes les toxines y compris la Cry5Ba.

5.3 Conductances et effet du pH

Les pores formés par la Cry5Ba dans les BLP sans récepteurs présentent des états de conductances ou sous-conductances multiples, à la fois en conditions ioniques de KCl à pH 6.0 et à 9.0. La gamme de conductances les plus souvent déterminées s'étend de 30 à 330 pS. Des conductances au dehors de cette gamme ont aussi été obtenues. À pH 6.0, les plus petites conductances qui pouvaient être identifiées variaient de 17 à 34 pS, alors que des grandes conductances atteignant jusqu'à 596 pS ont aussi été calculées. À pH 9.0, ces valeurs varient de 18 à 39 pS pour les petites conductances et s'étendaient jusqu'à 1092 pS ou plus.

La gamme des conductances rapportées dans cette étude pour la toxine nématocide Cry5Ba est comparable avec celle obtenue pour certaines toxines Cry insecticides. Par exemple, en conditions symétriques de 150 mM KCl à pH 9.5, les conductances des pores cationiques formés par la Cry1C dans les BLP sans récepteurs varient de 12 à 200 pS. Les conductances varient de 25 à 35 pS et de 100 à 140 pS pour les mêmes conditions ioniques mais à pH 6.0 (Schwartz *et al.*, 1993). Pour la Cry1C dans 300 mM KCl à pH 8.0, les conductances sont d'environ 21 à 250 pS (Peyronnet *et al.*, 2000a). De plus, des conductances aussi élevées que 4000 pS ont été rapportés pour les toxines Cry1Ac et Cry3A, dans les BLP (Slatin *et al.*, 1990).

Les petites conductances déterminées dans ce travail provenaient souvent de petits sauts individuels, mais souvent aussi de petits sauts de courant à partir de niveaux élevés de conductance. Dans cette étude, pour les deux conditions de pH utilisées, l'identification des

petites transitions a souvent été possible pour des potentiels supérieurs à ± 20 mV. Les grands niveaux de conductance, quant à eux, ont été obtenus de façon sporadique pour toute la gamme des potentiels imposés, mais plus souvent pour les valeurs plus élevées du potentiel. À pH alcalin, les grandes conductances ont été obtenues plus fréquemment qu'à pH acide. Ces dernières correspondaient souvent à des grandes ouvertures indépendantes (ouvertures d'un niveau de conductance à un autre niveau supérieur, suivi par des fermetures vers le même niveau de conductance inférieur initial). Cependant, des niveaux de sous-conductance ont parfois été observés pour ces grandes conductances. Un état de conductance est identifié comme une sous-conductance en utilisant les trois critères suivants (Fox, 1978) : i) une transition directe entre le niveau de sous-conductance et celui de conductance principale ou vice-versa a été observée; ii) l'état de sous-conductance n'est jamais observé en absence du niveau de conductance principale; iii) l'état de conductance principale ne résulte pas de la superposition de deux ou plusieurs canaux ouverts indépendamment.

Très fréquemment, les amplitudes de ces grands sauts de courant correspondaient à des multiples entiers des plus petites.

5.4 Oligomérisation

Il est possible que la multitude des conductances observée dans cette étude résulte de l'ouverture simultanée de plusieurs petits pores similaires qui s'associent sous forme d'agrégats ou que les pores de Cry5Ba soient des oligomères de dimensions différentes et constitués d'un nombre différent de pores unitaires identiques. Ainsi, les courants unitaires de Cry5Ba ont souvent été observés comme des transitions répétitives ou qui se superposaient les

unes aux autres, mais parfois présentaient aussi des états de sous-conductance. Pourtant, la plupart de grandes conductances semblent être approximativement des multiples entiers d'une conductance fondamentale élémentaire de 17 à 18 pS, à pH 6.0 et 9.0, respectivement. Cela est en effet, en accord avec les résultats de nombreuses études faites en BLP pour d'autres toxines Cry. La présence de conductances multiples et la formation d'oligomères ont été mis en évidence dans ces études (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Walters *et al.*, 1993; Von Tersch *et al.*, 1994; Racapé *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997b; Aronson *et al.*, 1999; Güereca et Bravo, 1999; Schwartz et Laprade, 2000; Soberón *et al.*, 2000; Peyronnet *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2002; Peyronnet *et al.*, 2002; Jiménez-Juárez *et al.*, 2007). Plusieurs de ces conductances résultent de la formation de pores multimériques, de structures et de tailles différentes, formés par oligomérisation de plusieurs molécules identiques de la toxine (Aronson *et al.*, 1999; Güereca et Bravo, 1999; Schwartz et Laprade, 2000; Soberón *et al.*, 2000; Peyronnet *et al.*, 2001). Une deuxième conformation pourrait dériver de la formation d'agrégats constitués d'un nombre différent de pores unitaires identiques, qui s'ouvriraient et se fermentaient de façon coopérative et synchronisée (Kaulin *et al.*, 1998; Goudet *et al.*, 1999). Ainsi, pour les pores formés dans les BLP sans récepteurs par la Cry1Aa, Schwartz *et al.* (1997b) ont identifié au moins cinq conductances variant de 11 à 52 pS, les plus grandes conductances étant approximativement des multiples (2 à 5 fois) de la plus petite conductance de 11 pS. L'oligomérisation des petits pores unitaires a ainsi été mise en évidence par ces auteurs. Par contre, pour la Cry1C, Schwartz *et al.* (1993) montrent que les conductances des pores formés à pH alcalin et variant de 12 à 200 pS possèdent plusieurs niveaux de sous-conductance. Par exemple, un pore de conductance maximale de 90 pS possédant quatre états de sous-conductance de 18, 36, 54 et 72 pS a été identifié, mais aucune superposition de pores

de ces amplitudes n'a pu être observée et la formation d'oligomères a donc été suggérée. Dans une autre étude sur la Cry1C, Peyronnet *et al.* (2002) ont montré que les pores formés en BLP sans récepteurs possédaient au moins 15 niveaux de conductance variant de 21 à 246 pS. La plupart des valeurs de ces conductances étaient différentes par d'environ 10 pS. L'étude réalisée en utilisant la technique d'exclusion de non-électrolytes et de PEG de poids moléculaires différents a démontré que les pores formés possédaient des rayons similaires variant de 1.0 à 1.3 nm. Les auteurs concluaient que les niveaux multiples de conductances étaient vraisemblablement dus à la formation d'agrégats constitués d'un nombre variable de pores unitaires similaires qui s'ouvrent et se ferment simultanément. D'ailleurs, l'oligomérisation n'est pas un phénomène limité aux toxines *Bt*. On l'observe également pour d'autres toxines PFT (Gisou van der Goot F. *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1996; Lesieur *et al.*, 1997; Kaulin *et al.*, 1998; Goudet *et al.*, 1999; Parker et Feil, 2005; Mani *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008). En conditions physiologiques, la formation d'agrégats de parfois 20 à 50 canaux ioniques est aussi un phénomène fréquent et essentiel à un certain nombre de fonctions cellulaires telle que la génération de potentiels d'actions (Jung *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2008).

Il est donc possible que les multiples conductances des pores de Cry5Ba correspondent soit à celles de pores multimériques indépendants, de diamètres différents, et dont la conductance variable dépend du nombre de monomères constituant le pore, soit à l'ouverture synchronisée d'un nombre variable de pores monomériques à peu près identiques, auto-assemblés en parallèle et très proches les uns des autres dans des agrégats ou « *clusters* » dans les BLP, comme il a été montré pour d'autres toxines PFT. Dans les BLP sans récepteurs, on

estime que les interactions intermoléculaires entre les monomères protéiques mènent à leur association et à la formation d'oligomères, mais la composition de la membrane lipidique et d'autres facteurs peuvent aussi être impliqués (Vachon *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2008; Young et Roberts, 2009; Dart, 2010) et constitue encore, à ce jour, un sujet de discussion important (Vachon *et al.*, 2012).

5.5 Cinétique

L'analyse des enregistrements courants des pores formés par la Cry5Ba a indiqué que leur comportement cinétique est variable soit sur la même membrane, soit pour le même potentiel imposé à deux membranes différentes. En général, la cinétique des pores a été souvent caractérisée par de longues ouvertures à un niveau principal de conductance à partir duquel se superposent des sauts de courant différents. Souvent, ces sauts sont en forme de bouffées très rapides, et souvent de grande amplitude. Cette activité en bouffées a souvent été observée à tous les potentiels imposés. Des cinétiques complexes du même genre ont aussi été observés pour les autres toxines Cry étudiées dans des conditions similaires (Schwartz *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 2001). Ces cinétiques ne semblent pas être affectées par le pH, par contre semblent varier légèrement avec le potentiel tel qu'observé pour des pores formés par d'autres toxines de *Bt* (English *et al.*, 1994; Schwartz *et al.*, 1997c; Peyronnet *et al.*, 2001).

5.6 Sélectivité ionique

Les expériences effectuées en conditions de gradient de concentration ionique de KCl de part et d'autre la bicouche, ont permis d'établir que les pores formés par la Cry5Ba sont peu sélectifs aux ions K^+ , indépendamment du pH. Nos résultats ont montré qu'aux deux valeurs de pH utilisés les pores formés par la Cry5Ba sont plutôt sélectifs aux cations avec une perméabilité relative P_K/P_{Cl} inférieure à 7. Cette sélectivité cationique relativement faible a aussi été observée pour d'autres toxines de *Bt* : Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997a), Cry1Ac (Slatin *et al.*, 1990; Walters *et al.*, 1993; Lorence *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997b; Smedley *et al.*, 1997; Potvin *et al.*, 1998a; Chandra *et al.*, 1999), Cry1B (Schwartz *et al.*, 1997b), Cry1C (Schwartz *et al.*, 1993; Racapé *et al.*, 1997; Peyronnet *et al.*, 2000a; Masson *et al.*, 2002), Cry2A (English *et al.*, 1994), Cry3Aa (Slatin *et al.*, 1990), Cry3B2 (Von Tersch *et al.*, 1994), Cry4B (Puntheeranurak *et al.*, 2004), Cyt1A (Knowles *et al.*, 1989) et Cyt2Aa1 (Knowles *et al.*, 1992). Cependant, contrairement à Cry5Ba la sélectivité ionique de certaines toxines dépend du pH. Ainsi, pour la toxine Cry1C, les pores enregistrés en BLP sont cationiques à pH alcalin et anioniques à pH acide (Schwartz *et al.*, 1993).

De plus, il n'est pas exclu que les pores de la Cry5Ba laissent eux aussi passer des composés neutres de grande taille comme il a été rapporté pour d'autres canaux de *Bt* (Sacchi *et al.*, 1986b; Knowles et Ellar, 1987; Hendrickx *et al.*, 1990; Carroll et Ellar, 1993a; Martin et Wolsfersberger, 1995; Villalon *et al.*, 1998b; Peyronnet *et al.*, 2000a; Peyronnet *et al.*, 2002). Comme pour les autres toxines insecticides de *Bt*, la nature cationique des pores formés par la Cry5Ba pourrait être un élément important de leur activité nématocide si la lyse osmo-colloïdale déclenchée par la toxine est aussi très dépendante des cations comme c'est le

cas chez l'insecte. À présent, aucune information n'est disponible pour les toxines Cry nématocides à ce sujet. Cependant, la conformité de leur structure 3D avec celle des Cry insecticides pourrait indiquer une similarité dans leur mode d'action.

CHAPITRE 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La formation de pores dans la membrane constitue une étape clé dans le mode d'action des toxines Cry du bacille de Thuringe. Certaines de ces toxines sont aptes à former des pores dans les BLP sans récepteurs. Les expériences réalisées dans ce travail ont permis de démontrer que la toxine nématocide Cry5Ba forme des pores dans les BLP sans récepteurs. La formation de pores a été observée à deux valeurs différentes de pH (6.0 et 9.0). Le pH acide semble favoriser la formation de pores en réduisant le temps d'insertion de la toxine ainsi que la concentration de toxine utilisée. La caractérisation au niveau électrophysiologique des pores de Cry5Ba a indiqué qu'ils possèdent plusieurs niveaux de conductance. Le pH ne semble cependant pas affecter significativement les conductances, bien qu'à pH alcalin les pores apparaissent plus stables. Les pores formés par la Cry5Ba sont plus probablement des oligomères de différentes tailles formés d'une organisation spatiale d'un nombre différent de pores élémentaires similaires, activés de façon synchronisée. Les résultats obtenus dans ce travail démontrent aussi que la Cry5Ba forme des pores de sélectivité cationique relativement faible, et cela indépendamment du pH.

Bien que les toxines formeuses de pores soient importantes pour la virulence de nombreuses bactéries pathogènes, leur mode d'action au niveau moléculaire reste encore à explorer. Chez *C. elegans*, la formation de pores lytiques par la Cry5Ba pourrait entre autres faire intervenir des mécanismes de défense cellulaire impliquant par exemple les voies de signalisation des kinases JNK et p38MAPK (Huffman *et al.*, 2004a; Huffman *et al.*, 2004b; Ideo *et al.*, 2009; Cancino-Rodeno *et al.*, 2010; Kao *et al.*, 2011). L'ensemble des

expériences décrites dans ce mémoire sur la Cry5Ba a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur le mode d'action des toxines nématocides. Celles-ci sont très importantes, car elles participeront non seulement à une meilleure compréhension du développement de la résistance aux antihelminthiques des vers parasites, mais aussi permettront la production éventuelle de nouveaux outils thérapeutiques mieux ciblés contre les infections STH et les autres nématodes parasitaires. Cela est d'autant plus critique si l'on considère que des combinaisons antihelminthiques contenant les toxines Cry5Ba, Cry21A agissent de façon fortement synergique (Hu *et al.*, 2010b). En outre, une autre hypothèse qui a été évoquée dans ce travail c'est que la toxine Cry5Ba pourrait aussi former des pores dans la membrane apicale des cellules intestinales des nématodes. Pour cette raison de pertinence biologique, des essais de dissection de petit géonématode *C. elegans* ont été effectués, ainsi que des tests préliminaires de viabilité en utilisant la microscopie à fluorescence et la technique de marquer fluorescent, l'homodimère-1 de l'éthidium (EthD-1). Ce marqueur est uniquement perméable aux cellules dont les membranes plasmiques sont endommagées. Les expériences préliminaires n'ont pas été concluantes, mais les travaux se poursuivent dans notre laboratoire afin d'évaluer l'effet potentiellement porogène de la Cry5Ba sur les cellules intestinales de *C. elegans*. Les travaux futurs viseront des études en microspectrofluorescence entreprises sur l'intestin entier ou les cellules dissociées enzymatiquement, au moyen de sondes de calcium (Fura 2) pour tester l'effet de Cry5Ba sur la signalisation calcique intracellulaire. D'autres sondes fluorescentes seront utilisées pour disséquer les cascades de signalisation impliquées. La technique de patch-clamp sera aussi utilisée sur un modèle expérimental d'intestin de nématode permettant de tester les effets de l'exposition extracellulaire et intracellulaire à la toxine Cry5Ba. L'évaluation de la formation de pores et de leurs propriétés

électrophysiologiques en BLP dopées par fusion de liposomes préparés par extrusion de récepteurs glycolipides extraits de nématodes sera aussi visée. De telles études exploratrices combinées aux résultats obtenus dans ce travail seraient particulièrement intéressantes puisqu'elles contribueraient de façon appréciable dans la compréhension plus précise du mode d'action des toxines Cry nématocides.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdullah M. A., A. P. Valaitis et D. H. Dean** (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. BMC Biochem., **7**: 16.
- Agrawal N., N. Arora et R. K. Bhatnagar** (2006). "Insights into mode of action of insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*". Dans: Current Concepts in Botany, K. G. Mukerji et C. Manoharachary (Éd.). 395-416, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Dehli, India.
- Ahmad W. et D. J. Ellar** (1990). Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. FEMS Microbiol. Letters, **56** (1-2): 97-104.
- Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter** (Éd.). Molecular Biology of the Cell. 4th ed. Garland Science Publishing, New York. 2002.
- Angst B. D., C. Marcozzi et A. I. Magee** (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. J. Cell Sci., **114**: 629-641.
- Angsuthanasombat C., N. Crickmore et D. J. Ellar** (1993). Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop of *Bacillus thuringiensis* CryIVB delta-endotoxin. FEMS Microbiol. Lett., **111**: 255-261.
- Arnold K., L. Bordoli, J. Kopp et T. Schwede** (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinform., **22**: 195-201.
- Aronson A. I.** (1993). The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. Mol. Microbiol., **7** (4): 489-496.
- Aronson A. I., C. Geng et L. Wu** (1999). Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. Appl Environ Microbiol., **65** (6): 2403-2507.
- Aronson A. I., E. S. Han, W. McGaughey et D. Johnson** (1991). The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. Appl. Environ. Microbiol., **57** (4): 981-986.
- Aronson A. I., D. Wu et C. Zhang** (1995). Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. J. Bacteriol., **177** (14): 4059-4065.
- Atkinson H. J., P. E. Urwin et M. J. McPherson** (2003). Engineering plants for nematode resistance. Ann. Rev. Phytopathol., **41**: 615-639.

- Atsumi S., Y. Inoue, T. Ishizaka, E. Mizuno, Y. Yoshizawa, M. Kitami et R. Sato** (2008). Location of the *Bombyx mori* 175 kDa cadherin like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. FEBS Lett., **276** (19): 4913-4926.
- Banks D. J., G. Hua et M. J. Adang** (2003). Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. Insect Biochem. Molec. Biol., **33**: 499-508.
- Barrows B. D., J. S. Griffiths et R. V. Aroian** (2006). *Caenorhabditis elegans* carbohydrates in bacterial toxin resistance. Methods Enzymol., **417**: 340-358.
- Barrows B. D., S. M. Haslam, L. J. Bischof, H. R. Morris, A. Dell et R. V. Aroian** (2007). Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in *Caenorhabditis elegans* from loss of fucose. J. Biol. Chem., **282** (5): 3302-3311.
- Bechtel D. B. et L. A. Bulla** (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol., **127** (3): 1472-1481.
- Bezrukov S. M. et I. Vadyanoy** (1993). Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states. Biophys. J., **64** (1): 16-25.
- Bietlot H. P., I. Vishnubhatla, P. R. Carey et M. Pozgay** (1990). Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. J., **267**: 309-315.
- Bone L. W., K. P. Bottjer et S. S. Gill** (1985). *Trichostrongylus colubriformis*: egg lethality due to *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin. Exp. Parasitol., **60**: 314-322.
- Boonserm P., P. Davis, D. J. Ellar et J. Li** (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J. Mol. Biol., **348** (2): 363-382.
- Boonserm P., M. Mo, C. Angsuthanasombat et J. Lescar** (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution J. Bacteriol., **188** (9): 3391-3401.
- Borgonie G., M. Clayes, F. Leyns, G. Arnaut et D. De Waele** (1995). The effect of nematicidal *Bacillus thuringiensis* strains on free-living nematodes.1. Light microscopic observations, species and biological stage specificity and identification of resistant mutant of *Caenorhabditis elegans*. Fundam. Appl. Nematol., **19** (4): 391-398.
- Bosch D., B. Schipper, H. van der Kleij, R. A. de Maagd et W. J. Stiekema** (1994). Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. Biotech., **12** (9): 915-918.

- Bottjer K. P. et L. W. Bone** (1987). Changes in the morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. J. Nematol., **19** (3): 282-286.
- Bravo A., S. S. Gill et M. Soberón** (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon., **49** (4): 423-435.
- Bravo A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill et M. Soberón** (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim. Biophys. Acta, **1667** (1): 38-46.
- Brunet J. F., V. Vachon, M. Juteau, J. Van Rie, G. Larouche, C. Vincent, J. L. Schwartz et R. Laprade** (2010). Pore-forming properties of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry9Ca in *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. Biochem. Biophys. Acta., **1798** (6): 1111-1118.
- Bulla L. A., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson et P. C. Fitz-James** (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. Crit. Rev. Microbiol., **8** (2): 147-204.
- Burton S. L., D. J. Ellar, J. Li et D. J. Derbyshire** (1999). Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. Mol. Biol., **287** (1011-1022).
- Butko P.** (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. App. Environ. Microbiol., **69** (5): 2415-2422.
- Butko P., M. Cournoyer, M. Carey-Pusztai et W. K. Surewicz** (1994). Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C. FEBS Lett., **340** (1): 89-92.
- Cancino-Rodeno A., C. Alexander, R. Villaseñor, S. Pacheco, H. Porta, Y. Pauchet, M. Soberón, S. S. Gill et A. Bravo** (2010). The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. Biol., **40** (1): 58-63.
- Cappello M., R. D. Bunqiro, L. M. Harrison, L. J. Bischof, J. S. Griffiths, B. D. Barrows et R. A. Aroian** (2006). A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. PNAS, **103** (41): 15154-15159.
- Carroll J., M. G. Wolfersberger et D. J. Ellar** (1997). The *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-induced permeability change in *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles proceeds by more than one mechanism. J. Cell Sci., **110** (3099-3104).

- Carroll J. et D. J. Ellar** (1993a). An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect midgut membrane permeability using a light scattering assay. Eur. J. Biochem., **214**: 771-778.
- Carroll J. et D. J. Ellar** (1993b). Proteolytic processing of coleopteran specific δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*. Eur. J. Biochem., **214**: 771-778.
- Carroll J. et D. J. Ellar** (1997). Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. Eur. J. Biochem., **245** (3): 797-804.
- Cetintas R. et M. M. Yarba** (2010). Nematicidal effects of five plant essential oils on the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* Race 2. J. Anim. Vet. Adv., **9** (2): 222-225.
- Chandra A., P. Ghosh, A. D. Mandaokar, A. K. Bera, R. P. Sharma, S. Das et P. A. Kumar** (1999). Amino acid substitution in α -helix 7 of Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner. FEBS Lett., **458**: 175-179.
- Chen C.-S., C.-Y. Kao, K. Day et R. V. Aroian** (2007). Systematic analysis of the mode of action of *Bt* crystal toxin Cry5B in *Caenorhabditis elegans*. Intern. Worm Meeting.
- Chen J., M. R. Brown, G. Hua et M. J. Adang** (2005). Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Cell Tissue Res., **321** (1): 123-129.
- Chen X. J., A. Curtiss, E. Alcantara et D. H. Dean** (1995). Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane. J. Biol. Chem., **270**: 6412-6419.
- Chen X. J., M. K. Lee et D. H. Dean** (1993). Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit across *Bombyx mori* midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90** (19): 9041-9045.
- Choma C. T. et H. Kaplan** (1990). Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. Biochem., **29** (49): 10971-10977.
- Choma C. T. et H. Kaplan** (1992). *Bacillus thuringiensis* crystal protein: effect of chemical modification of the cysteine and lysine residues. J. Invertebr. Pathol., **59** (1): 75-80.
- Ciordia H. et W. E. Bizell** (1961). A preliminary report on the effect of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on the development of the free-living stages of some cattle nematodes. J. Parasitol., **47**: 41.

- Colquhoun D. et A. G. Hawkes** (1995). "The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms". Dans: Single-channel recording. Second Edition, B. Sakmann et E. Neher (Éd.). 397-482, Plenum Press, New York.
- Crickmore N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schenpf, B. Lambert, D. Lereclus, C. Gawron-Burke et D. H. Dean** (1995). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis cry* genes. 28^e Annual Congress of the Society for Invertebrate Pathology, Ithaca, N.Y.: 14.1995
- Crickmore N., D. R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo et D. H. Dean** (2012). "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature." http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Damgaard P. H.** (2000). "Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment". Dans: Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-LeRoux (Éd.). 23-40, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dart C.** (2010). Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. J. Physiol., **588**: 3169-3178.
- de Maagd R. A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore et H. E. Schnepf** (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annu. Rev. Entomol., **37**: 409-433.
- de Maagd R. A., A. Bravo et N. Crickmore** (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Genetics, **17** (4): 193-199.
- de Maagd R. A., H. Van der Klei, P. L. Bakker, W. J. Stiekema et D. Bosch** (1996a). Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. App. Environ. Microbiol., **62** (8): 2753-2757.
- de Maagd R. A., M. S. G. Kwa, H. van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper et J. M. Vlak** (1996b). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1A(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. Appl. Environ. Microbiol., **62** (5): 1537-1543.
- de Maagd R. A., M. Weemen-Hendriks, W. Stiekema et D. Bosch** (2000). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domaine III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. Appl. Environ. Microbiol., **66** (1): 1559-1563.
- Dorsch J. A., M. Candas, N. B. Griko, W. S. Maaty, E. G. Midboe, R. K. Vadlamudi et L. A. Bulla Jr** (2002). Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R(1) in *Manduca sexta*:

- involment of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Molec. Biol., **32** (9): 1025-1036.
- Dowling J. E.** (Éd.). Neurons and Networks: An introduction to behavioral neuroscience. 2nd Ed. President and Fellows of Harvard College, USA. 2001.
- Du C., P. A. W. Martin et K. W. Nickerson** (1994). Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl. Environ. Microbiol., **60** (10): 3847-3853.
- Elliot A. M., H. Mpairwe, M. A. Quigley, M. Nampijja, L. Muhangi, J. Oweka-Onyee, M. Muwanga, J. Ndibazza et J. A. G. Whitworth** (2005). Helminth infection during pregnancy and development of infantile eczema. J. Am. Med. Assoc., **294** (16): 2032-2034.
- Endo Y. et J. Nishiitsutsuji-Uwo** (1980). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol., **36** (1): 90-103.
- English L., H. L. Robbins, M. A. V. Tersch, C. A. Kulesza, D. Ave, D. Coyle, C. S. Jany et S. L. Slatin** (1994). Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Insect Biochem. and Molec. Biol., **24** (10): 1025-1035.
- English L. H., R. T. Readdy et A. L. Bastian** (1991). Delta-endotoxin induced leakage of $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ and H_2O from phospholipid vesicles is catalysed by reconstituted midgut membrane. Insect Biochem., **21**: 177-184.
- Escrache B., N. de Decker, J. van Rie, S. Jansens et E. v. Kerkhove** (1998). Changes in permeability of brush border membrane vesicles from *Spodoptera littoralis* midgut induced by insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., **64**: 1563-1565.
- Fabrick J., C. Oppert, M. D. Lorenzen, K. Morris, B. Oppert et J. L. Jurat-Fuentes** (2009). A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. J. Biol. Chem., **284** (3): 18401-18410.
- Federici B. A., H.-W. Park et D. K. Bideshi** (2010). Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. O. Toxinol. J., **3**: 83-100.
- Feil S. C., G. Polekhina, M. A. Gorman et M. W. Parker** (2010). "Introduction". Dans: Proteins: Membrane binding and pore formation, G. Anderluh et J. Lakey (Éd.). 1-9, Landes Bioscience/Springer Science, New York.
- Feitelson J. S.** (1995). *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 delta endotoxin. Molecular Biology. Mycogen Corporation, San Diego, CA.

- Feitelson J. S., J. Payne et L. Kim** (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. Biotech., **10** (3): 271-275.
- Feng K.-C., B.-L. Liu, H.-S. Chan et Y.-M. Tzeng** (2001). Morphology of a spectrum of parasporal endotoxin crystals from cultures of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* isolate A3-4. World J. Microbiol. & Biotech., **17**: 119-123.
- Fernandez L. E., K. G. Aimanova, S. S. Gill, A. Bravo et M. Soberón** (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. Biochem., **394**: 77-84.
- Ferré J.** (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol., **47**: 501-533.
- Ferré J., M. D. Real, J. V. Rie, S. Jansens et M. Peferoen** (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 5119-5123.
- Flannagan R. D., C. G. Yu, J. P. Mathis, T. E. Meyer, X. Shi, H. A. Siqueira et B. D. Siegfried** (2005). Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera, Crambidae). Insect Biochem. Molec. Biol., **35**: 33-40.
- Fortier M., V. Vachon, M. Kirouac, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2005). Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. J. Membr. Biol., **208**: 77-87.
- Fox J. A.** (1978). Ion channel subconductance states. J. Membr. Biol., **97**: 1-8.
- Frutos R., C. Rang et M. Royer** (1999). Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Critical Rev. Biotech., **19** (3): 227-276.
- Fuller V. L., C. J. Lilley et P. E. Urwin** (2008). Nematode resistance (Review). New Phytologist, **180** (1): 27-44.
- Gahan L. J., F. Gould et D. G. Heckel** (2001). Identification of a gene associated with *Bacillus thuringiensis* resistance in *Heliothis virescens*. Science, **293**: 857-860.
- Gahan L. J., Y. Pauchet, H. Vogel et D. G. Heckel** (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. PLoS Genet., **6** (12): e1001248.
- Galitsky N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn et L. English** (2001). Structure of the insecticidal bacteria δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. Acta. Cryst., **D57**: 1101-1109.

- Garczynski S. F. et J. P. Siegel** (2007). "Bacteria". Dans: Field manual of techniques in invertebrate pathology, L. A. Lacey et H. K. Kaya (Éd.). 175-198, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Gazit E., D. Bach, I. D. Kerr, M. S. P. Sansom, N. Chenjanovsky et Y. Shai** (1994). The alpha-5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: in vitro activity, ion-channel formation and molecular modeling. Biochem. J., **304**: 895-902.
- Gazit E., P. La Rocca, M. S. P. Sansom et Y. Shai** (1998). The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domaine of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an 'umbrella-like' structure of the pore. PNAS, **95** (21): 12289-12294.
- Gazit E. et Y. Shai** (1993). Structural characterization of membrane interaction, and specific assembly within phospholipid membranes of hydrophobic segments from *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* cytolytic toxin. Biochem., **32** (46): 12363-12371.
- Gerber D. et Y. Shai** (2000). Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. J. Biol. Chem., **275** (31): 23602-23607.
- Gill S. S., E. A. Cowles et V. Francis** (1995). Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem., **270**: 27277-27282.
- Gill S. S., E. A. Cowles et P. V. Pietrantonio** (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol., **37**: 615-636.
- Girard F., V. Vachon, G. Lebel, G. Préfontaine, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2009a). Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. Biochim. Biophys. Acta, **1788** (2): 575-580.
- Girard F., V. Vachon, G. Préfontaine, L. Marceau, J.-L. Schwartz, L. Masson et R. Laprade** (2009b). Helix $\alpha 4$ of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin plays a critical role in the postbinding steps of pore formation. Appl. Environ. Microbiol., **75** (2): 359-365.
- Girard F., V. Vachon, G. Préfontaine, L. Marceau, Y. Su, G. Larouche, C. Vincent, J.-L. Schwartz, L. Masson et R. Laprade** (2008). Cysteine scanning mutagenesis of alpha 4, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. Appl. Environ. Microbiol., **74** (9): 2565-2572.
- Gisou van der Goot F., F. Pattus, K. R. Wong et J. Thomas Buckley** (1993). Oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin precedes insertion into lipid bilayers. Biochem., **32** (10): 2636-2642.

- Glare T. R. et M. O'Callaghan** (Éd.). *Bacillus thuringiensis: biology, ecology, and safety*. Wiley, West Sussex, U.K. 2000.
- Gohar M., N. Gilois, R. Graveline, C. Garreau, V. Sanchis et D. Lereclus** (2005). A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics*, **5** (14): 3696-3711.
- Gómez I., D. H. Dean, A. Bravo et M. Soberón** (2003). Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. *Biochem.*, **42** (35): 10482-10489.
- Gómez I., J. Miranda-Rios, E. Rudiño-Piñera, D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo et M. Soberón** (2002). Hydropathic complementary determines interaction of epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK₈₇₆ in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.*, **277**: 30137-30143.
- Gómez I., L. Pardo-López, C. Muñoz-Garay, L. E. Fernandez, C. Pérez et J. Sánchez** (2007). Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt proteins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, **28**: 169-173.
- González A., R. Diaz, M. Diaz, Y. Borrero, R. Y. Bruzon, B. Carreras et R. Gato** (2011). Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. *Int. J. Trop. Biol.*, **59** (3): 1007-1016.
- Gonzalez M. R., M. Bischofberger, L. Pernot, F. G. van der Goot et B. Freche** (2008). Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell. Mol. Life. Sci.*, **65** (3): 493-507.
- Goudet C., J. P. Benitah, M. L. Milat, H. Sentenac et J. B. Thibaud** (1999). Cluster organization and pore structure of ion channels formed by beticolin 3, a nonpeptidic fungal toxin. *Biophys. J.*, **77** (6): 3052-3059.
- Griffits J. S. et R. V. Aroian** (2005). Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins (Review article). *BioEssays*, **27**: 614-624.
- Griffits J. S., S. M. Haslam, H. Morris, P. S. Cremer, A. Dell, M. J. Adang et R. V. Aroian** (2005). Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, **307** (5711): 922-925.
- Griffits J. S., D. L. Huffman, J. L. Whitacre, B. D. Barrows, L. D. Marroquin, R. M. Iler, J. R. Brown, T. Hennet, J. D. Esko et R. V. Aroian** (2003). Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J. Biol. Chem.*, **278** (46): 45594-45602.
- Griffits J. S., J. L. Whitacre, D. E. Stevens et R. V. Aroian** (2001). *Bt* toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*, **293**: 860-864.

- Gringorten J. L.** (2001). "Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*". Dans: Biochemical sites of insecticide action and resistance, I. Ishaaya (Éd.). 167-207, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Grochulski P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau et M. Cygler** (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol., **254** (3): 447-464.
- Groulx N., H. McGuire, R. Laprade, J.-L. Schwartz et R. Blunck** (2011). Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAa reveals tetramerization. J. Biol. Chem., **286** (49): 42274-42282.
- Güereca L. et A. Bravo** (1999). The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, **1429** (2): 342-350.
- Guo S., S. Ye, Y. Liu, L. Wei, J. Xue, H. Wu, F. Song, J. Zhang, X. Wu, D. Huang et Z. Rao** (2009). Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. J. Struct. Biol., **168** (2): 259-266.
- Gupta B. L., J. A. T. Dow, T. A. Hall et W. R. Harvey** (1985). Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*. J. Cell. Sci., **74**: 137-152.
- Haider M. Z. et D. J. Ellar** (1989). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta, **978**: 216-222.
- Heimpel A. M. et T. A. Angus** (1959). The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Pathol., **1**: 152-170.
- Held G. A., B. J. L. A. , E. Ferrari, J. Hoch, A. I. Aronson et S. A. Minnich** (1982). Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**: 6065-6069.
- Hendrickx K., A. DeLoof et H. van Mellaert** (1990). Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. Comp. Biochem. Physiol., **95** (2): 241-245.
- Herández-Fernández J., L. Ramírez, N. Ramírez, L. Fuentes et J. Jiménez** (2011). Molecular and biological characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains for controlling tomato leafminer (*Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Colombia. World J. Microb. Biot., **27** (3): 579-590(12).

- Hernández C. S., R. Andrew, Y. Bel et J. Ferré** (2005). Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. J. Invertebr. Pathol., **88** (1): 8-16.
- Hill A. S., A. Nishino, K. Nakajo, G. Zhang, J. R. Fineman, N. E. Selzer, Y. Okamura et E. C. Cooper** (2008). Ion channel clustering at the Axon Initial Segment and Node of Ranvier evolved sequentially in early chordates. PloS Genet., **4** (12): e1000317.
- Hille B.** (1992a). "Equilibrium potentials and the Nernst equation". Dans: Ionic channels of excitable membranes (Éd.). 11-20, Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Hille B.** (1992b). "Selective permeability: independence". Dans: Ionic channels of excitable membranes (Éd.). 337-361, Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Hine R.** (Éd.). "Membrane" the Facts of file Dictionary of Biology. 3rd ed. Checkmark, New York. 1999: 198.
- Höfte H., H. de Greve, J. Seurinck, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Vanderbruggen, M. van Montagu, M. Zabeau et M. Vaeck** (1986). Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* 1715. Eur. J. Biochem., **161** (2): 273-280.
- Höfte H. et H. R. Whiteley** (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev., **53** (2): 242-255.
- Honée G. et B. Visser** (1993). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Entomol. exp. appl., **69** (2): 145-155.
- Hongyu Z., Y. Ziniu et D. Wangxi** (2000). Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. Crop Protection, **19**: 449-454.
- Hotez P. J. et al.** (2006). "Helminth infections: soil-transmitted infections and schistosomiasis". Dans: Disease control priorities in developing countries, 2nd edition, D. T. Jamison, J. G. Breman, A. R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D. B. Evans, P. Jha, A. Mills et P. Musgrove, World Bank, Washington (DC).
- Hu Y., S. B. Georghiou, A. J. Kelleher et R. V. Aroian** (2010a). *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. PloS Neglect. Trop. D., **4** (3): e614.
- Hu Y., E. G. Platzer, A. Bellier et R. V. Aroian** (2010b). Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107** (13): 5955-5960.
- Hu Y., B. Zhan, B. Keegan, Y. Y. Yiu, M. M. Miller, K. Jones et R. V. Aroian** (2012). Mechanistic and single-dose *in vivo* therapeutic studies of Cry5B anthelmintic action against hookworms. PloS. Neglect. Trop. D., **6** (11): e1900.

- Hua G., J. L. Jurat-Fuentes et M. J. Adang** (2004). Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. J. Biol. Chem., **279**: 28051-28056.
- Hua G., R. Zhang, M. A. Abdullah et M. J. Adang** (2008). *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. Biochem., **47**: 5101-5110.
- Huffman D. L., L. Abrami, R. Sasik, J. Corbeil, F. G. van der Goot et R. V. Aroian** (2004a). Mitogen activated protein pathways defend against bacterial pore-forming toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101** (30): 10995-11000.
- Huffman D. L., L. J. Bischof, J. S. Griffiths et R. V. Aroian** (2004b). Pore worms: Using *Caenorhabditis elegans* to study how bacterial toxins interact with their target host. Int. J. Med. Microbiol., **293**: 599-607.
- Hui F., U. Scheib, Y. Hu, R. J. Sommer, R. V. Aroian et P. Ghosh** (2012). Structure and glycolipid binding properties of the nematicidal protein Cry5B. Biochemistry, **51** (49): 9911-9921.
- Ideo H., K. Fukushima, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, K. Dejima, K. Nomura et K. Yamashita** (2009). A *Caenorhabditis elegans* glycolipid-binding galectin functions in host-defense against bacterial infection. J. Biol. Chem., **284** (39): 26493-26501.
- Iocavache I., F. G. van der Goot et L. Pernot** (2008). Pore formation: an ancient yet complex form of attack. Biochim. Biophys. Acta(1778).
- ISAAA** (2010). "Global status of commercialized biotech. GM crops: 2010." <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/pressrelease/default.asp>.
- Jenkins J. L., M. K. Lee, A. P. Valaitis, A. Curtiss et D. H. Dean** (2000). Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. J. Biol. Chem., **275** (19): 14423-14331.
- Jiménez-Juárez N., C. Muñoz-Garay, I. Gómez, G. Saab-Rincon, J. Y. Damian-Almazo, S. S. Gill, M. Soberón et A. Bravo** (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. J. Biol. Chem., **282** (29): 21222-21229.
- Jin R. G., Y. B. Liu, B. E. Tabashnik et D. Borthakur** (2000). Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. Capitata) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation In Vitro Cell. Dev. Biol., **36**: 231-237.
- Jung P., S. Zeng et J. W. Shuai** (2003). Signals from clustered channels. Adv. Solid State Phys., **43**: 68-116.

- Jurat-Fuentes J. L. et M. J. Adang** (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur. J. Biochem., **271** (15): 3127-3135.
- Jurat-Fuentes J. L. et M. J. Adang** (2006). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. J. Invertebr. Pathol., **92**: 166-171.
- Kaelin P. et F. Gadani** (2000). Occurance of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. Current Microbiol., **40** (3): 205-209.
- Kanintrokul Y., I. Sramala, G. Katzenmeir, S. Panyim et C. Angsuthanasombat** (2003). Specific mutations within alpha4-alpha5 of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveal a crucial role of Asn-166 and Tyr-170. Mol. Biotechnol., **24** (1): 11-20.
- Kao C. Y., F. C. O. Los, D. L. Huffman, S. Wachi, N. Kloft, M. Husmann, V. Karabrahimi, J.-L. Schwartz, A. Bellier, C. Ha, Y. Sagong, H. Fan, P. Ghosh, M. Hsieh, C.-S. Hsu, L. Chen et R. V. Aroian** (2011). Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. PLoS Pathogens, **7** (3): e1001314.
- Kaulin Y. A., L. V. Schagina, S. M. Bezrukov, V. V. Malev, A. M. Feigin, J. Y. Takemoto, J. H. Teeter et J. G. Brand** (1998). Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. Biophys. J., **74** (6): 2918-2925.
- Keeton T. P. et L. A. Bulla Jr.** (1997). Ligand specificity and affinity of BT-R1, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. Appl. Environ. Microbiol., **63** (9): 3419-3425.
- Keller M., B. Sneh, N. Strizhov, E. Prudovsky, A. Regev, C. Koncz, J. Schell et A. Zilberstein** (1996). Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. Insect Biochem. Molec. Biol., **26** (4): 365-373.
- Keller R.** (2011). "Fungicides most used pesticide globally." Dans: *AG Professional Magazine*, Vance Publishing Corp., Lincolnshire, IL.
- Kho M. F., A. Bellier, V. Balasubramani, Y. Hu, W. Hsu, C. Nielsen-LeRoux, S. M. McGillivray, V. Nizet et R. V. Aroian** (2011). The pore-forming protein Cry5B elicits the pathogenicity of *Bacillus* sp. against *Caenorhabditis elegans*. PloS One, **6** (12): e29122.
- Kirouac M., V. Vachon, M. Fortier, M.-C. Trudel, A. Berteloot, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2006). A mechanical force contributes to the 'osmotic swelling' of brush-border membrane vesicles. Biophys. J., **91** (9): 3301-3312.
- Kirouac M., V. Vachon, J.-F. Noel, F. Girard, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2002). Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis*

- toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta, **1561** (2): 171-179.
- Kirouac M., V. Vachon, S. Rivest, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2003). Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. J. Membrane Biol., **196**: 51-59.
- Knight P. J. K., N. Crickmore et D. J. Ellar** (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol., **11** (3): 429-436.
- Knight P. J. K., B. H. Knowles et D. J. Ellar** (1995). Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. J. Biol. Chem., **270**: 17765-17770.
- Knowles B. H.** (1994). "Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -endotoxins". Dans: Advances in Insect Physiology, P. D. Evans (Éd.). 275-308, Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Knowles B. H., M. R. Blatt, M. Tester, J. M. Horsnell, J. Carroll, G. Menestrina et D. J. Ellar** (1989). A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers FEBS Lett., **244** (2): 259-262.
- Knowles B. H. et J. A. T. Dow** (1993). The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. BioEssays, **15** (7): 469-476.
- Knowles B. H. et D. J. Ellar** (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta **924** (3): 509-518.
- Knowles B. H., P. H. Francis et D. J. Ellar** (1986). Structurally related *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins display major differences in insecticidal activity *in vivo* and *in vitro*. J. Cell Sci., **84**: 221-236.
- Knowles B. H., P. J. White, C. N. Nicholls et D. J. Ellar** (1992). A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. Proc. R. Soc. Lond. B, **248** (1321): 1-7.
- Kotze A. C., J. O'Grady, J. M. Gough, R. Pearson, N. H. Bagnall, D. H. Kemp et R. J. Akhurst** (2005). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of economically-important nematode parasites of livestock. Int. J. Parasit., **35** (1013-1022).
- Koulen P.** (2003). "Using bilayer lipid membranes to investigate the pharmacology of intracellular calcium channels". Dans: Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications, H. T. Tien et A. Ottova-Leitmannova (Éd.). 723-734, Elsevier Science B. V. , Amsterdam, The Netherlands.

- Krasilnikov O. V. et R. Z. Sabirov** (1992). Comparative analysis of latrotoxin channels of different conductance in planar lipid bilayers. Evidence of cluster organization. Biochim. Biophys. Acta, **1112** (1): 124-128.
- Kristan K., Z. Podlesek, V. Hojnik, I. Gutierrez-Aguirre, G. Guncar, D. Turk, J. M. Gonzalez-Manas, J. H. Lakey, P. Macek et G. Anderluh** (2004). Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable {beta}-sandwich. J. Biol. Chem., **279**: 46509-46517.
- Kumar A. S. M. et A. I. Aronson** (1999). Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. J. Bacteriol., **181** (19): 6103-6107.
- Laflamme E., A. Badia, M. Lafleur, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2008). Atomic force microscopy imaging of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin interacting with insect midgut apical membranes. J. Membr. Biol., **222** (3): 127-139.
- Lane N. J., J. B. Harrison et W. M. Lee** (1989). Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial δ -endotoxin. J. Cell. Sci., **93**: 337-347.
- Larocque R., M. Casapia et E. Gotuzzo** (2005). Relationship between intensity of soil-transmitted helminth infections and anemia during pregnancy. Am. J. Trop. Med. Hyg., **73** (4): 783-789.
- Larsen E. H., S. E. Gabriel, M. J. Stutts, J. Fullton, E. M. Price et R. C. Boucher** (1996). Endogenous chloride channels of insect Sf9 cells. Evidence for coordinated activity of small elementary channel units. J. Gen. Physiol., **107** (6): 695-714.
- Laskowski R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss et J. M. Thornton** (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Cryst., **26**: 283-291.
- Laurent V., D. R. Brooks, D. Coates et R. E. Isaac** (2001). Functional expression and characterization of the cytoplasmic aminopeptidase P of *Caenorhabditis elegans*. Eur. J. Biochem., **268** (20): 5430-5438.
- Lebel G., V. Vachon, G. Préfontaine, F. Girard, L. Masson, M. Juteau, A. Bah, G. Larouche, C. Vincent, R. Laprade et J.-L. Schwartz** (2009). Mutations in domain I of interhelical loops affect the rate of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in insect midgut brush border vesicles. Appl. Environ. Microb., **75** (12): 3842-3850.
- Lecadet M.-M. et R. Dedonder** (1971). Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. Eur. J. Biochem., **23**: 282-294.

- Lee M. K., F. Rajamohan, J. L. Jenkins, A. S. Curtiss et D. H. Dean** (2000). Role of two arginine residues in domain II, loop 2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. Mol. Microbiol., **38**: 289-298.
- Lee M. K., F. S. Walters, H. Hart, N. Palekar et J.-S. Chen** (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., **69** (8).
- Lee M. K., T. H. You, F. L. Gould et D. H. Dean** (1999). Identification of residues in Domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. Appl. Environ. Microbiol., **65** (10): 4513.
- Lee M. K., B. A. Young et D. H. Dean** (1995). Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun., **216** (1): 306-312.
- Lesieur C., B. Vecsey-Semjn, L. Abrami, M. Fivaz et F. G. van der Goot** (1997). Membrane insertion: the strategy of toxins. Mol. Membr. Biol., **14**: 45-64.
- Leyns F., G. Borgonie, G. Arnaut et D. De Waele** (1995). Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. Fundam. Appl. Nematol., **18** (3): 211-218.
- Li J., J. Carrol et D. J. Ellar** (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature, **353** (6347): 815-821.
- Li X.-Q., A. Tan, M. Voegtline, S. Bekele, C.-S. Chen et R. V. Aroian** (2008). Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. Biol. Control, **47**: 97-102.
- Li X.-Q., J.-Z. Wei, A. Tan et R. V. Aroian** (2007). Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematicidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. Plant Biotech., **5** (455-464).
- Lifshitz M. et V. Gavrilov** (2000). Central nervous system toxicity and early peripheral neuropathy following dermal exposure to methyl bromide. J. Toxicol. Clin. Toxicol., **38** (7): 799-801.
- Likitvivatanavong S., G. Katzenmeier et C. Angsuthanasombat** (2006). Asn¹⁸³ in $\alpha 5$ is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. Arch. Biochem. Biophys., **445** (46-55).
- Liu Y. B. et B. E. Tabashnik** (1997). Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis* Proc. R. Soc. Lond. B, **264** (1381): 605-610.

- Lorence A., A. Darszon et A. Bravo** (1997). Aminopeptidase dependant pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. FEBS Lett., **414**: 303-307.
- Lorence A., A. Darszon, C. Diaz, A. Liévano, R. Quintero et A. Bravo** (1995b). δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. FEBS Lett., **360** (3): 217-222.
- Loseva O., M. Ibrahim, M. Candas, C. N. Koller, L. S. Bauer et L. A. B. Jr** (2002). Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Insect Biochem. Molec. Biol., **32** (5): 567-577.
- Lu H., F. Fajamohan et D. H. Dean** (1994). Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIA(a) associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. J. Bacteriol., **176** (17): 5554-5559.
- Luo K., Y.-J. Lu et M. J. Adang** (1996). A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol., **26** (8-9): 783-781.
- Luo K., S. Sangandala, L. Masoon, A. Mazza, R. Brousseau et M. J. Adang** (1997). The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as 'receptor A' by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation. Insect Biochem. Molec. Biol., **27**: 735-743.
- MacIntosh S. C., S. L. McPherson, F. J. Perlak, P. G. Marrone et R. L. Fuchs** (1990). Purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* insecticidal proteins in E. coli. Biochem. Biophys. Res. Comm., **170** (2): 665-672.
- Maduell P., R. Callejas, K. R. Cabrera, G. Armengol et S. Orduz** (2002). Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels. Microb. Ecol., **44**: 144-153.
- Mani R., S. D. Cady, M. Tang, A. J. Waring, R. I. Lehrer et M. Hong** (2006). Membrane-dependant oligomeric structure and pore formation of a beta-hairpin antimicrobial peptide in lipid bilayer from solid-state NMR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103** (44): 16242-16247.
- Marroquin L. D., D. Elyassnia, J. S. Griffiths, J. S. Feitelson et R. A. Aroian** (2000). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Genetics, **155** (4): 1693-1699.
- Martin G. F. et M. G. Wolsfersberger** (1995). *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles act synergistically to cause very large increase in the conductance of planar lipid bilayers. J. Exp. Biol., **195**: 92-96.

- Masson L., Y.-J. Lu, A. Mazza, R. Brousseau et M. J. Adang** (1995). The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. J. Biol. Chem., **270** (35): 20309-20315.
- Masson L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas et R. Brousseau** (1994). Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependant on the bioassay system. Mol. Microbiol., **14** (5): 851-860.
- Masson L., B. E. Tabashnik, Y. B. Liu, R. Brousseau et J.-L. Schwartz** (1999). Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. J. Biol. Chem., **274** (45): 1996-2000.
- Masson L., B. E. Tabashnik, A. Mazza, G. Prefontaine, L. Potvin, R. Rossea et J.-L. Schwartz** (2002). Mutagenic analysis of a conserved region of Domain III in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., **68** (1): 194-200.
- McGaughey W. H.** (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, **229** (4709): 193-195.
- McGaughey W. H.** (1994). Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Agricul. Ecosys. Environ., **49** (1): 95-102.
- McGee J. D.** (2007). "The *C. elegans* intestine". Dans: Wormbook, The *C. elegans* Research Community-Wormbook (Éd.). doi/10.1895/wormbook.1.133.1, <http://www.wormbook.org>.
- McNail R. J. et M. J. Adang** (2003). Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. Insect Biochem. Mol. Biol., **33** (10): 999-1010.
- Meves H.** (1984). "Hudgkin-Huxley: Thirty Years After". Dans: Current topics in membranes and transport, Volume 22. The Squid Axon, A. Kleinzeller et P. F. Baker (Éd.). 279-329, Academic Press Inc., Orlando, FL.
- Mikkola A. R., G. A. Carlberg, T. Vaara et H. G. Gyllenberg** (1982). Comparison of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains. An electron microscope study. FEMS Microbiol. Letters, **13** (4): 401-408.
- Miranda R., F. Z. Zamudio et A. Bravo** (2001). Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. Insect Biochem. Mol. Biol., **31** (12): 1155-1163.
- Moffet D. F., A. Koch et R. Woods** (1995). Electrophysiology of K⁺ transport by midgut epithelium of lepidopteran insect larvae: III. Goblet valve petency. J. Exp. Biol., **198** : 2103-2113.

- Molinari S.** (2011). Natural genetic and induced plant resistance, as control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. . Plant Cell Rep., **30** (3): 311-323.
- Monette R., L. Potvin, D. BAines, R. Laprade et J.-L. Schwartz** (1997). Interaction between calcium ions and *Bacillus thuringiensis* toxin activity against Sf9 cells (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera). App. Environ. Microbiol., **63**: 440-447.
- Morin S., R. W. Biggs, M. S. Sisteron, L. Shriver, C. Ellers-Kirk, D. Higginson, D. Holley, L. J. Gahan, D. G. Heckel, Y. Carrière, T. J. Dennehy, J. K. Brown et B. E. Tabashnik** (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100** (9): 5004-5009.
- Morse R. J., T. Yamamoto et R. M. Stroud** (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure, **9** (5): 409-417.
- Muller P., D. O. Rudin, H. T. Tien et W. C. Wescott** (1962a). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. Nature, **194**: 979-980.
- Muller P., D. O. Rudin, H. T. Tien et W. C. Wescott** (1962b). Reconstitution of excitable cell membrane structure *in vitro*. Circulation, **26**: 1167-1171.
- Nair M. S., X. S. Liu et D. H. Dean** (2008). Membrane insertion of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin: single mutation in domain II block partitioning of the toxin into the brush border membranes. Biochem., **47** (21): 5814-5822.
- O'Brien K. P., S. Franjevic et J. Jones** (2009). Green chemistry and sustainable agriculture: the role of biopesticides.
- OMS** (2010). "World Malaria Report 2010." WHO Technial Report Series, WC 765, http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html.
- OMS** (2011). "Initiative for Vaccine Research (IVR): Parasitic Diseases." http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index2.html.
- OMS** (2012). "Partners for parasite control. Geographical distributions and useful facts and stats." <http://www.who.int/wormcontrol/statistics/geographical/en/>.
- Oppert B., K. J. Kramer, D. Johnson, S. J. Upton et W. H. McGaughey** (1996). Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxic. Insect Biochem. Molec. Biol., **26** (6): 571-583.
- Oppert B., K. J. Kramer, D. E. Johnson, S. C. MacIntosh et W. H. McGaughey** (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **198**: 940-947.

- Ounjai P., V. M. Unger, F. J. Sigworth et C. Angsuthanasombat** (2007). Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation. Biochem. Biophys. Res. Commun., **361**: 890-895.
- Pang A. S., J. L. Gringorten et C. Bai** (1999). Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes. Can. J. Microbiol., **45** (10): 816-825.
- Parker M. W. et S. C. Feil** (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. Prog. Biophys. Mol. Biol., **88** (1): 91-142.
- Percy J. et P. G. Fast** (1983). *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. J. Invertebr. Pathol., **41**: 86-98.
- Peyronnet O., F. G  n  reux, B. Nieman, V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz** (2000a). Pore size of ion channels formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin. Med. Microbiol. Immunol., **189**: 44.
- Peyronnet O., B. Nieman, G. G  n  reux, V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz** (2002). Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin in planar lipid bilayers. Biochem. Biophys. Acta, **1567** (1-2): 113-122.
- Peyronnet O., V. Vachon, R. Brousseau, D. Baines, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (1997). Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. Appl. Environ. Microbiol., **63** (3): 1679-1684.
- Peyronnet O., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2000b). Ion channel activity from the midgut brush-border membrane of gypsy moth (*Lymantria Dispar*) larvae. The Journal of Experimental Biology, **203**: 1835-1844.
- Peyronnet O., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2001). Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of Gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. J. Membrane Biol., **184**: 45-54.
- Pigott C. R. et D. J. Ellar** (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microb. Mol. Biol. Rev., **71** (2): 255-281.
- Potvin L., R. Laprade et J.-L. Schwartz** (1998). Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from intracellular stores in Cfl cells (*Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera). J. Exp. Biol., **201**: 1851-1858.
- Puntheeranurak T., P. Uawithya, L. Potvin, C. Angsuthanasombat et J.-L. Schwartz** (2004). Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its alpha1-alpha5 fragment. Mol. Membr. Biol., **21** (1): 67-74.

- Racapé J., D. Granger, J. F. Noulin, V. Vachon, C. Rang, R. Frutos, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (1997). Properties of the pores formed by parental and chimeric *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in planar lipid bilayer membranes. Biophys. J., **72**: A82.
- Rahardja U. et M. E. Whalon** (1995). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* CryIIIA delta-endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol., **88** (1): 21-26.
- Rajagopal R., N. Agrawai, A. Seivapandiyan, S. Sivakumar, S. Ahmad et R. K. Bhatnagar** (2003). Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closeley related Cry proteins. Biochem. J., **370**: 971-978.
- Rajagopal R., N. Arora, S. Sivakumar, N. G. Rao, S. A. Nimbalkar et R. K. Bhatnagar** (2009). Resistance of *Helicoverpa armigera* to CryIAc toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. Biochem. J., **419**: 309-316.
- Rajagopal R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra et R. K. Bhatnagar** (2002). Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. J. Biol. Chem., **277** (49): 46849-46851.
- Rajangopal R., N. Agrawai, A. Seivapandiyan, S. Sivakumar, S. Ahmad et R. K. Bhatnagar** (2003). Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closeley related Cry proteins. Biochem. J., **370**: 971-978.
- Rodriguez-Almazán C., E. Z. Reyes, F. Zúñiga-Navarrete, C. Muñoz-Garay, I. Gómez, A. M. Evans, S. Likitvivatanavong, A. Bravo, S. S. Gill et M. Soberón** (2012). Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. Biochem. J., **443**: 711-717.
- Rolle R. L., A. O. Ejiofor et T. L. Johnson** (2005). Determination of the plasmid size and location of δ -endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis. A. J. Biotech., **4** (7): 580-585.
- Sacchi V. F., P. Parenti, G. M. Hanozet, B. Giordana, P. Lüthy et M. G. Wolfersberger** (1986). *Bacillus thuringiensis* toxins inhibits K⁺-gradient-dependant amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. FEBS Lett., **204** (2): 213-218.
- Samir N., M. Weemen-Hendriks, S. Dukiandjiev et R. A. de Maagd** (2001). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryI hybrid proteins with increased activity against the Colorado Potato Beetle. Appl. Environ. Microbiol., **67** (11): 5328-5330.

- Saxena D. et G. Stotzky** (2001). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria and fungi in soil. Soil Biol. Biochem., **33**: 1225-1230.
- Schmidt U., G. Guigas et M. Weiss** (2008). Cluster formation of transmembrane proteins due to hydrophobic mismatching. Phys. Rev. Lett., **101**: 128104.
- Schneider S. M., E. N. Rosskopf, J. G. Leesch, D. O. Chellemi, C. T. Bull et M. Mazzola** (2003). Research on alternatives to methyl bromide: pre-plant and post-harvest. Pest Manag. Sci., **59** (6-7): 814-826.
- Schnepf E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler et D. H. Dean** (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62** (3): 775-806.
- Schnepf H. E. et H. R. Whiteley** (1981). Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78** (5): 2893-2897.
- Schnepf H. E. et H. R. Whiteley** (1985). Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Biol. Chem., **260** (10): 6273-6280.
- Schwartz J.-L., L. Garneau, L. Masson et R. Brousseau** (1991). Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. Biochem. Biophys. Acta, **1065**: 250-260.
- Schwartz J.-L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau et E. Rousseau** (1993). Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. Journal Membrane Biology, **132** (1): 53-62.
- Schwartz J.-L., M. Juteau, P. Grochulski, M. Cygler, G. Préfontaine, R. Brousseau et L. Masson** (1997a). Restriction of intramolecular movements within the CryIAa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. FEBS Lett., **410** (2-3): 397-402.
- Schwartz J.-L. et R. Laprade** (2000). "Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation". Dans: Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-LeRoux (Éd.). 199-217, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Schwartz J.-L., Y.-J. Lu, P. Sohnlein, R. Brousseau, R. Laprade, L. Masson et M. J. Adang** (1997b). Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. FEBS Lett., **412** (2): 270-276.
- Schwartz J.-L., L. Potvin, X. J. Chen, R. Brousseau, R. Laprade et D. H. Dean** (1997c). Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels

- formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. Appl. Environ. Microbiol., **63** (10): 3978-3984.
- Schwartz J.-L., L. Potvin, F. Coux, J. F. Charles, C. Berry, M. J. Humphreys, A. F. Jones, I. Bernhart, M. Dalla Serra et G. Menestrina** (2001). Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. J. Membr. Biol., **184** (2): 171-183.
- Schwenkenbecher J. M. et R. M. Kaplan** (2009). Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance-associated mutations in *Ancylostoma caninum*. Exp. Parasitol., **122** (1): 6-10.
- Shan S., L. Xia, X. Ding, Y. Zhang, S. Hu, Y. Sun, Z. Yu et L. Han** (2011). Homology modeling of Cry1Ac toxin-binding alkanline phosphatase receptor from *Helicoverpa armigera* and its functional interpretation. Chin. J. Chem., **29**: 427-432.
- Shitomi Y., T. Hayakawa, D. M. Hossain, M. Higuchi, K. Miyamoto, K. Nakanishi, R. Sato et H. Hori** (2006). A novel 96-kDa aminopeptidase localized on epithelial cell membranes of *Bombyx mori* midgut, which binds to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biochem., **139**: 223-233.
- Siegel J. P.** (2001). The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. J. Invertebr. Pathol., **77**: 13-21.
- Slatin S. L., C. K. Abrams et L. English** (1990). Delta-toxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. Biochem. and Biophys. Research Communications, **169** (2): 765-772.
- Smedley D., G. Armstrong et D. J. Ellar** (1997). Channel activity caused by a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin preparation depends on the method of activation. Mol. Membr. Biol., **14**: 13-18.
- Soberon M., L. Pardo, C. Munoz-Garay, J. Sanchez, I. Gomez, H. Porta et A. Bravo** (2010). Pore formation by Cry toxins. Adv. Exp. Med. Biol., **677**: 127-142.
- Soberón M., R. V. Pérez, M. E. Nunez-Valdéz, A. Lorence, I. Gómez, J. Sánchez et A. Bravo** (2000). Evidence of intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett., **191** (2): 221-225.
- Starr J. L., J. Bridge et R. Cook** (2002). "Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential". Dans: Plant resistance to parasitic nematodes, J. L. Starr et J. Bridge (Éd.). 1-22, CAB International, Wallingford.
- Tabashnik B. E.** (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol., **39**: 47-79.

- Tabashnik B. E., Y. Carrière, T. J. Dennehy, S. Morin, M. S. Sisterson, R. T. Roush, A. M. Shelton et J. Z. Zhao** (2003). Insect resistance to transgenic *Bt* crops: Lessons from the laboratory and field. J. Econ. Entomol., **96** (4): 1031-1038.
- Tabashnik B. E., N. L. Cushing, N. Finson et M. W. Johnson** (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol., **83** (5): 1671-1676 (6).
- Terra W. et W. Ferreira** (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartamentalization and function. Comp. Biochem. Physiol., **109B**: 1-62.
- Tiewsiri K. et C. Angsuthanasombat** (2007). Structurally conserved aromaticity of Tyr²⁴⁹ and Phe²⁶⁴ in helix 7 is important for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. J. Biochem. Mol. Biol., **40** (2): 163-171.
- Tigue N. J., J. Jacoby et D. J. Ellar** (2001). The α -Helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins App. Environ. Microbiol., **67** (12): 5715-5720.
- Torres J., X. Lin et P. Boonserm** (2008). A trimeric building block model for Cry toxins in vitro ion channel formation. Biochim. Biophys. Acta, **1778** (2): 392-397.
- Tran L. B., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2001). Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. Appl. Environ. Microbiol., **67** (10): 4488-4494.
- Upadhyay R. K.** (Éd.) (2003). "Advances in microbial control insect pests", Kluwer Academic, New York.
- Vachon V., R. Laprade et J.-L. Schwartz** (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. J. Invertebr. Pathol., **111** (1): 1-12.
- Vachon V., J.-L. Schwartz et R. Laprade** (2006). Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetics of pore formation by Cry toxins. J. Invert. Pathol., **92** (3): 160-165.
- Vadlamudi R. K., T. H. Ji et B. J. L. A.** (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. J. Biol. Chem., **268** (17): 12334-12340.
- Vadlamudi R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji et L. A. J. Bulla** (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem., **270**: 5490-5494.

- Valaitis A. P., J. L. Jenkins, M. K. Lee, D. H. Dean et K. J. Garner** (2001). Isolation and partial characterization of Gypsy moth BTR-270 an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. Arch. Ins. Biochem. Physiol., **46**: 186-200.
- Valaitis A. P., A. Mazza, R. Brousseau et L. Masson** (1997). Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes. Insect Biochem. Molec. Biol., **27** (6): 529-539.
- van Frankenhuyzen K.** (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. J. Invertebr. Pathol., **101** (1): 1-16.
- Van Rie J., W. H. McGaughey, D. E. Johnson, B. D. Barnett et H. v. Mellaert** (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, **247** (4938): 72-74.
- Veening J.-W., H. Murray et J. Errington** (2009). A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. Genes & Develop., **23**: 1959-1970.
- Vié V., N. Van Mau, P. Pomarède, C. Dance, J.-L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, C. Rang, L. Masson, F. Heitz et C. Le Grimmellec** (2001). Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. J. Membr. Biol., **180** (3): 195-203.
- Villalon M., V. Vachon, R. Brousseau, J.-L. Schwartz et R. Laprade** (1998). Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. Biochim. Biophys. Acta, **1368**: 27-34.
- Von Tersch M. A., S. L. Slatin, C. A. Kulesca et L. H. English** (1994). Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. Appl Environ Microbiol., **60** (10): 3711-3717.
- Walters F. S., S. L. Slatin, C. A. Kulesza et L. H. English** (1993). Ion channel activity of N-terminal fragments from Cry1A(c) delta-endotoxin. Biochem. Biophys. Res. Comm., **196** (2): 921-926.
- Wang P., Z. Zhang et J. Zhang** (2005). Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Insect Biochem. Molec. Biol., **35**: 611-620.
- Wang P., J. Z. Zhao, A. Rodrigo-Simón, W. Kain, A. F. Janmaat, A. M. Shelton, J. Ferré et J. Myers** (2007). Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Appl. Environ. Microbiol., **73** (4): 1199-1207.
- Wei J. Z., K. Hale, L. Carta, E. Platzer, C. Wong, S.-C. Fang et R. A. Aroian** (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. PNAS, **100** (5): 2760-2765.

- Whalon M. E. et B. A. Wingerd** (2003). Bt: Mode of action and use. Arch. Ins. Biochem. Physiol., **54**: 200-211.
- White S. H.** (1986). "The physical nature of planar bilayer membranes". Dans: Ion Channel Reconstitution, C. Miller (Éd.). 3-35, Plenum Press, New York.
- Wolfersberger M. G.** (1989). Neither barium nor calcium prevent the inhibition by *Bacillus thuringiensis*-endotoxin of sodium or potassium gradient dependant amino acid accumulation by tobacco hornworm midgut brush border membrane. Arch. Insect Biochem. Biophys., **12**: 267-277.
- Wu D. et A. I. Aronson** (1992). Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. J. Biol. Chem., **267** (4): 2311-2317.
- Xie R., M. Zhuang, L. S. Ross, I. Gómez, D. I. Oltean, A. Bravo, M. Soberón et S. S. Gill** (2005). Single amino acid mutation in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. J. Biol. Chem., **280**: 8416-8425.
- Xu X., L. Yu et Y. Wu** (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. App. Environ. Microbiol., **71**: 948-954.
- Yaoi K., T. Kadotani, H. Kuwana, A. Shikawa, T. Takahashi, H. Iwahan et R. Isato** (1997). Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. Eur. J. Biochem., **42** (3): 634-641.
- Young T. M. et C. J. Roberts** (2009). Structure and thermodynamics of colloidal protein cluster formation: Comparison of square-well and simple dipolar models. J. Chem. Phys., **131** (12): 125104.
- Zhang R., G. Hua, T. M. Andacht et M. J. Adang** (2008). A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. Biochem., **47** (43): 11263-11272.
- Zhang X., M. Candas, N. B. Griko, L. Rose-Young et L. A. Bulla Jr.** (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R₁ expressed in insect cells. Cell Death Diff., **12**: 1407-1416.
- Zhang X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig et L. A. Bulla Jr.** (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. PNAS, **103** (26): 9897-9902.